

VŠB – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Detekce částic v biologickém materiálu z lidského  
reprodukčního systému

Particle detection in biological material from the human  
reproductive system

**Student:** Eliška Wehowská

**Vedoucí bakalářské práce:** Mgr. Kristina Čabanová, Ph.D.

**Datum odevzdání:** 21. 5. 2018

Ostrava 2018

## Zadání bakalářské práce

Student: **Eliška Wehowská**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: **Detekce částic v biologickém materiálu z lidského reprodukčního systému**  
**Particle detection in biological material from the human reproductive system**

Jazyk vypracování: čeština

### Zásady pro vypracování:

Cílem práce bude studium možných souvislostí mezi výskytem částic v biologickém materiálu z lidských reprodukčních orgánů a poruchami reprodukčního cyklu. Bakalářská práce bude vypracována ve spolupráci s Fakultní nemocnicí v Ostravě (FNO).

V rámci zadané práce bude vypracován přehled výskytu mikronových a submikronových částic v prostředí, jejich vliv na živé systémy a možné cesty vstupu do lidského organismu. Dále budou charakterizovány poruchy reprodukce a bude zpracována statistika výskytu těchto poruch. V rámci teoretické části bude provedena rešerše metod, používaných při detekci částic v biologickém materiálu.

V praktické části práce bude s využitím Ramanovy mikrospektroskopie a skenovací elektronové mikroskopie analyzován biologický materiál získaný z lidského reprodukčního systému dodaný FNO. Bude hodnocen výskyt částic, převážně na bázi kovů, jejich chemické a fázové složení, morfologie a velikost. Získané výsledky budou statisticky vyhodnoceny.

### Seznam doporučené odborné literatury:

FILIPOVÁ, Zuzana; KUKUTSCHOVÁ, Jana; MAŠLÁŇ, Miroslav. Rizika nanomateriálů. Univerzita Palackého, 2012.

<https://www.andrologyaustralia.org/your-health/male-infertility/>

HULL, M. G., et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br Med J (Clin Res Ed), 1985, 291.6510: 1693-1697.

DOHLE, Gert R., et al. EAU guidelines on male infertility. European urology, 2005, 48.5: 703-711.

TREMELLEN, Kelton. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. Human reproduction update, 2008, 14.3: 243-258.

AGARWAL, Ashok; MAKKER, Kartikeya; SHARMA, Rakesh. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. American journal of reproductive immunology, 2008, 59.1: 2-11.

SALEH, Ramadan A.; HCLD, ASHOK AGARWAL. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Journal of Andrology, 2002, 23.6: 737-752.

YOSHIDA, S., et al. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. International journal of andrology, 2009, 32.4: 337-342.


OBERDÖRSTER, Günter, et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and fibre toxicology, 2005, 2.1: 8.

Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.


Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Kristina Čabanová**

Datum zadání: 28.11.2017

Datum odevzdání: 21.05.2018

  
\_\_\_\_\_  
prof. Ing. Jaromír Pištor, CSc.  
vedoucí katedry



  
\_\_\_\_\_  
Ing. Zdeňka Chmelíková, Ph.D.  
prorektorka pro studium

### **Místopřísežné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě dne: .....

podpis: .....

## **Prohlašuji, že:**

- Jsem byla seznámena, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména § 35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a § 60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen „VŠB – TUO“ má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§ 35 odst. 3).
- Souhlasím s tím, že bakalářská práce bude v elektronické podobě uložena v Ústřední knihovně VŠB – TUO k nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o kvalifikační práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB – TUO v případě zájmy z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1988 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne: .....

Podpis: .....

Jméno a příjmení autora práce:

Eliška Wehowská

Adresa trvalého pobytu autora práce:

Ostravská 611/40, Hlučín

## **Poděkování**

Tato práce vyšla za přispění projektu č. SP2018/81 (Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR).

Především bych chtěla poděkovat své vedoucí Mgr. Kristině Čabanové, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutou literaturu, cenné rady, ochotu a hlavně trpělivost, kterou se mnou při zpracování této práce měla.

Velké díky patří také Ing. Ľubomíře Kuzníkové za provedení analýz vzorků ejakulátu. Dále bych chtěla poděkovat také doc. MUDr. Janě Dvořáčkové, Ph.D. z Ústavu Patologie Fakultní nemocnice Ostrava a RNDr. Magdaléně Uvírové, Ph.D. z CGB laboratoře a.s., Ostrava.

## **Anotace**

Tato bakalářská práce se zabývá detekcí částic v lidském ejakulátu a jejich možnou souvislostí s neplodností. Vzorky, které nám poskytla CGB laboratoř klinické genetiky v Ostravě – Vítkovicích byly analyzovány skenovacím elektronovým mikroskopem a Ramanovým mikrospektroskopem. Ve vzorcích byly detekovány částice na bázi kovů, konkrétně částice s obsahem železa, hliníku, mědi, zinku, chromu, titanu a niklu. Současně byly zjištěny sloučeniny titanu a uhličitan vápenatý. U mnohých z těchto látek bylo již prokázáno negativní působení na živý organismus. Na základě zjištěných informací může existovat určitá závislost mezi přítomností pevných kovových částic v mužském ejakulátu a poruchou plodnosti.

**Klíčová slova:** mužská neplodnost, částice na bázi kovů, skenovací elektronová mikroskopie, Ramanova mikrospektroskopie.

## **Anotation**

This bachelor thesis deals with particle detection in human ejaculate and their possible relation to infertility. Samples provided by the CGB Laboratories of Clinical Genetics in Ostrava - Vítkovice were analyzed using a scanning electron microscope and Raman microscopy. Particles based on metal, specifically particles of iron, aluminum, copper, zinc, chromium, titanium and nickel were detected in the samples. Titanium compounds and calcium carbonate were also found. Many of these substances have been shown to have negative effects on the living organism. The information found indicates that there is some dependence between the presence of metal particles in the male ejaculate and the infertility disorder.

**Key words:** male infertility, metal based particles, scanning electron microscopy, Raman microspectroscopy.

# Obsah

Seznam použitých značek a symbolů .....	9
1. ÚVOD.....	12
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
2.1. Nanomateriály.....	13
2.2. Dělení nanomateriálů.....	14
2.2.1. Rozdělení podle tvaru .....	14
2.2.2. Rozdělení podle původu.....	16
2.3. Zdroje nanomateriálů .....	17
2.4. Nanomateriály a živé organismy .....	18
2.5. Osud a vliv nanočástic v těle .....	22
2.6. Mužský reprodukční systém .....	27
2.6.1. Základní anatomie.....	27
2.6.2. Fyziologie mužského pohlavního ústrojí .....	29
2.6.3. Fragmentace DNA spermií .....	31
2.6.4. Vliv nanočástic na mužský reprodukční systém.....	31
3. PRAKTICKÁ ČÁST .....	33
3.1. Použité přístroje .....	33
3.1.1. Ramanův mikrospektrometr .....	33
3.1.2. Skenovací elektronový mikroskop (SEM) .....	34
3.2. Vzorky.....	35
3.2.1. Příprava vzorků.....	35
3.3. Výsledky a diskuze.....	36
3.3.1. Částice detekované pomocí SEM - EDS.....	37
3.3.2. Částice detekované pomocí Ramanovy mikrospektroskopie .....	43
4. Závěr.....	47
5. Použitá literatura.....	48



## Seznam použitých značek a symbolů

0D – bezrozměrný

1D – jednorozměrný

2D – dvourozměrné

3D – trojrozměrné

AgNP – nanočástice stříbra

Al – hliník

BSE – zpětně odražené elektrony

Ca – vápník

CaCO<sub>3</sub> – uhličitan vápenatý

CdO – oxid kadmnatý

Cr – chrom

Cu – měď

CVD – chemická depozice par

D – aerodynamický průměr částice

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDS – energicky disperzní rentgenová spektroskopie

ENMs – cíleně připravené nanomateriály (z ang. engineered nanomaterials)

EU – Evropská unie

Fe – železo

GI – gastrointestinální trakt

$\text{H}_2\text{O}_2$  – peroxid vodíku

$\text{HClO}$  – kyselina chlorná

$\text{HO}^\bullet$  - hydroxylová radikál

$\text{HO}_2^\bullet$  - hydroperoxyl

Li – lithium

Na – sodík

Ni – nikl

$\text{O}_2^\bullet$  - superoxid

$\text{O}_3$  – ozon

PM<sub>10</sub> – částice s maximálním průměrem 10  $\mu\text{m}$  (z ang. particulate matter)

PM<sub>2,5</sub> - částice s maximálním průměrem 2,5  $\mu\text{m}$  (z ang. particulate matter)

$\text{RO}^\bullet$  - alkoxy

$\text{ROO}^\bullet$  - peroxy

ROS – reaktivní formy kyslíku (z ang. reactive oxygen species)

RTG – rentgen

SE – sekundární elektrony

SEM – skenovací elektronový mikroskop

TEM – transmisní elektronový mikroskop

Ti – titan

$\text{TiO}_2$  – oxid titaničitý

$\text{TiO}_2\text{NO}$  – nanočástice oxidu titaničitého

Zn – zinek

ZnO – oxid zinečnatý

ZnO NP – nanočástice oxidu zinečnatého

## 1. ÚVOD

V současné době dochází k rozšíření nanotechnologií do stále většího množství oborů. Nanotechnologie a nanomateriály dostávají čím dál větší prostor kvůli svým odlišným a výrazně lepším technickým vlastnostem. Z toho důvodu je člověk téměř denně vystaven jejich působení. Nanomateriály jsou běžnou součástí například kosmetiky, potravin, léčiv, obalových hmot, náplní do tiskáren a dalších. Kromě toho velká část submikronových částic a nanočástic se dostává do prostředí prostřednictvím běžných antropogenních procesů, jako je průmysl, lokální topení, nebo jízda automobilem. Nejvíce zatížená jsou samozřejmě velká průmyslová města, kde se kvalita ovzduší velmi znatelně zhoršuje. Pevné částice velmi malých (nano) rozměrů totiž nesedimentují a jsou trvale přítomné ve vzduchu. Velmi snadno pak můžou být vdechnuty či požit.

Nanomateriálům se věnuje stále větší pozornost, nejen kvůli jejich chemickému složení, ale především kvůli jejich velikosti, se kterou přímo souvisí jejich specifické vlastnosti. Nejvýznamnější vlastností nanočástic je ve vztahu k živému organismu jejich vysoká reaktivita. Vzhledem k tomu, že jsou nanotechnologie relativně mladým oborem, není toho o chování nanočástic ve vztahu k živým organismům mnoho známo. To jsou důvody, proč se touto problematikou zabývá stále více světových studií.

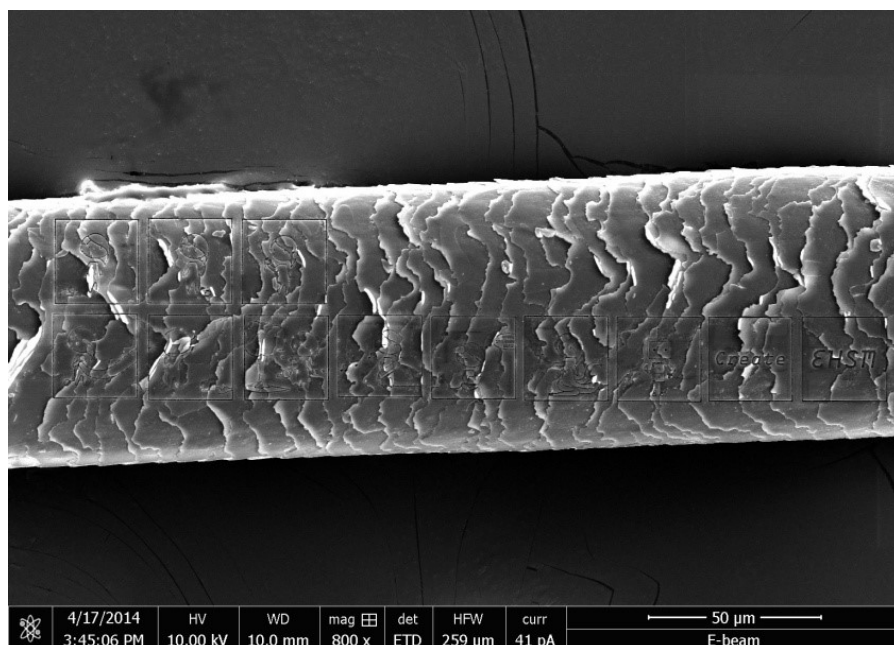
Současně jedním z narůstajících problémů dnešní společnosti je stoupající neplodnost u mužů. Přesné příčiny nejsou zcela známy, ale pravděpodobně jde o kombinaci mnoha faktorů. Kromě genetických poruch, jsou to různé onemocnění, chemické látky, životní styl atd. Nelze tedy vyloučit, že také nanomateriály mají určitý podíl na tomto problému.

Cílem této práce bylo prověřit možnou závislost mezi nanomateriály a problematikou mužské neplodnosti. Pomocí vybraných optických metod byly detekovány pevné částice, převážně na bázi kovů

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Nanomateriály

Nanomateriály jsou obecně chemické látky, nebo materiály ve velmi malém měřítku. Pro představu až 10 000 krát menší, než je průměr lidského vlasu [2].



Obrázek 1: snímek lidského vlasu pod skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) [50].

Předpona nano pochází z řeckého slova „návoσ“, to v českém překladu znamená „trpaslík“ a představuje hodnotu  $10^{-9}$ , tj. miliardtinu jednotky [2]. V Evropě existují definice, které charakterizují nanomateriál jako:

*„Přírodní, náhodný nebo vyrobený materiál obsahující částice v nenavázaném stavu nebo jako agregát nebo jako aglomerát a kde 50% nebo více částic v rozložení velikosti čísel má jeden nebo více vnějších rozměrů v rozmezí 1 nm - 100 nm.“*

*„Ve zvláštních případech a tam, kde je to odůvodněno obavami z hlediska životního prostředí, zdraví, bezpečnosti nebo konkurenceschopnosti, může být prahové číslo pro rozdělení velikosti 50% nahrazeno prahovou hodnotou mezi 1 a 50%“.*

*„Odchylně od výše uvedených skutečností by měly být považovány za nanomateriály fullereny, grafenové vločky a jednobuněčné uhlíkové nanotrubic s jedním nebo více vnějšími rozměry pod 1 nm.“* (DOPORUČENÍ KOMISE o definici nanomateriálu 2011/696/EU). Tuto definici EU přijala v roce 2011, v roce 2016 bylo její znění

diskutováno a bylo připuštěno, že se znění definice může měnit v průběhu poznávání chování nanomateriálů [2].

Pojem „nanomateriál“ je používám v souvislosti s materiálem, jehož strukturu tvoří stavební jednotky s jasně definovanými vlastnosti, jako je např. rozměr, tvar, nebo atomová struktura. Rozměry stavebních jednotek jsou limitovány velikostí 100 nm alespoň v jednom směru. Stavebními jednotkami nanomateriálů mohou být částice, nebo shluky částic. Základním prvkem nanomateriálů je nanostruktura, ta je dostatečně malá na to, aby se v ní uplatňovaly kvantové jevy. Neplatí to však vždy a nanostruktura může být rozměrná tak, že se na ní tyto jevy již neuplatňují. Neobvyklé vlastnosti nanostruktur souvisí s jejich odlišnou elektronovou strukturou, výrazným uplatňováním van der Waalsových sil, elektrostatických sil apod. [1, 2].

Výroba nanomateriálů se tak rozvinula díky tomu, že nanomateriály vykazují nové, lepší vlastnosti ve srovnání s materiálem stejným, který ale nanometrické částice neobsahuje.

Obecně do nanomateriálů patří nanočástice, nanoprášky, kompozitní materiály obsahující nanočástice, tenké vrstvy, polymerní nanokompozity, nanokeramika apod.

## **2.2. Dělení nanomateriálů**

Pojmenování „nanomateriál“ je velmi obecné, proto se dále mohou nanomateriály rozdělovat dle různých hledisek. Nejzákladnější rozdělení je podle tvaru a podle způsobu vzniku, tedy původu.

### *2.2.1. Rozdělení podle tvaru*

Při vývoji nanotechnologií se začalo produkovat čím dál větší množství nanomateriálů, které kdysi nebyly nijak charakterizovány a rozděleny. Proto bylo nutné nějakou klasifikaci zavést. První klasifikační myšlenka byla vyslovena Herbertem Gleiterem již v roce 1995 a v roce 2000 ji Anatolij Skorokhod rozšířil. H. Gleiter považoval za základ svého schématu klasifikace krystalické formy a chemické složení, kde byly interkrystalické hranice zrna a nízkodimenzionální krystaly považovány za stavební jednotky. Toto rozdělení však nebylo zvažováno, jelikož nijak nezohledňovalo 0D a 1D struktury, jako jsou nanotrubičky, fullereny a nanovlákná. Pokropivny a Skorokhod (2007) předcházející klasifikační schéma modifikovaly a zahrnuli do něj také 0D a 1D struktury. Toto rozdělení je používáno dodnes [3, 4].

**0D nanomateriály** – do této skupiny se řadí nanomateriály, kde žádný rozměr nepřesahuje definici nanomateriálu. To znamená, že všechny rozměry jsou menší než 100 nm. Patří zde např. nanočástice, kvantové tečky, fullereny nebo tzv. „nanocibule“.

**1D nanomateriály** – zde se řadí nanomateriály, kde jeden rozměr nesplňuje podmínku nanomateriálů. Jeden rozměr je tedy větší než hranice 100 nm. Můžeme zde zařadit např. nanotrubičky, nanotyčinky (ang. nanorods), nanostuhy (ang. nanoribbons) nebo nanodrátky.

**2D nanomateriály** – dvourozměrné nanomateriály jsou nanomateriály, kde dva rozměry jsou větší než hranice 100 nm. Do této skupiny nanomateriálů patří např. nanovrstvy, nanofilmy, nanovlákná, nanodisky, nanohranoly (ang. nanoprisms), nebo nanopovlaky.

**3D nanomateriály** – jsou materiály, které nejsou omezeny v žádném směru hranici 100 nm. Tyto materiály mají nanoskopickou strukturu nebo mají vlastnosti, které se vyskytují na nanoměřítku. Mohou být složené z více nanometrických krystalů jako jsou nanotrubičky, nanovlákná, dispergované nanočástice, nebo vícevrstvé nanomateriály. Takové materiály se nazývají hromadné (ang. bulk) [3,4,5].

Uvedené rozdělení však není jediné, které se používá. Existuje také jiné rozdělení, které sice nanomateriály rozděluje také podle dimenzí (rozměrů), avšak tato klasifikace zohledňuje to, kolik rozměrů splňuje maximum 100 nm.

**1D nanomateriály** – do jednorozměrných nanomateriálů patří takové materiály, kde jeden rozměr je pod hranici 100 nm. Lze zde zařadit např. nanovrstvy, nanofilmy nebo nanopovlaky

**2D nanomateriály** – dvourozměrné nanomateriály jsou materiály, kde dva rozměry splňují podmínku, že jsou menší než 100 nm. Patří zde např. nanotrubičky, nanotyčinky (ang. nanorods.) nebo nanodrátky.

**3D nanomateriály** – do poslední skupiny patří materiály, které ve všech třech svých směrech mají rozměry menší než 100 nm. Mezi tyto nanomateriály pak patří např. nanočástice, kvantové tečky nebo fullereny [1].

### 2.2.2. Rozdělení podle původu

Nanomateriály mohou mít různý původ. Základní dělení však rozděluje nanomateriály na tři hlavní skupiny. První skupinou jsou přírodní materiály, druhou skupinou jsou nanomateriály nezáměrně vytvořené člověkem a poslední skupinou jsou nanomateriály, které člověk vytvořil záměrně.

- **Přírodní nanomateriály** - tyto materiály se vyskytují běžně v přírodě již od nepaměti a umožňují přiblížení a pochopení vlastností nanomateriálů v laboratořích [6]. Patří sem například částice prachu, které mohou vznikat při erupcích sopek nebo lesních požárech. Přírodní nanomateriály jsou ale také v jemném mořském aerosolu, písku a půdních koloidech. Jako částice v rozměrech „nano“ se také vyskytují viry, DNA, proteiny, pyl, aj [18, 19]. Také rostliny mohou být spojovány s nanomateriály. Např. lotosový květ, konkrétně jeho listy jsou pokryty hydrofobní vrstvou, která zapříčiňuje to, že voda a různé nečistoty po listech stékají ve formě kapek. To je způsobeno tím, že vrstva listů je tvořena nanostrukturou [17]. Z živočišné říše stojí za zmínku gekon, jehož nohy jsou pokryty velkým počtem „výběžků“, které se ještě dále člení a tím vzniká velký povrch, který gekon může při svém pohybu využít. Může tedy chodit na různých površích v různých směrech, a to dokonce i hlavou dolů [6]. Další dvě skupiny patří mezi antropogenní nanomateriály. Antropogenní původ těchto materiálu znamená, že je vytvořil člověk. Dělí se na:

- **Nanomateriály vzniklé jako vedlejší produkt** - tyto nanomateriály nejsou člověkem vytvořeny záměrně, ale vznikají jako vedlejší produkt při různých procesech. Nemají zcela definovanou velikost a ne vždy je známo jejich přesné chemické složení [20, 21].

- **Cíleně připravené nanomateriály** ENMs (z ang. engineered nanomaterials) – jsou materiály, které se mohou do prostředí uvolňovat ve všech fázích svého životního cyklu, tedy během jejich cílené přípravy, přepravy k místu využití, spotřeby a likvidaci [22]. U těchto nanomateriálů je většinou definovaná velikost i složení [20, 21]. V současné době je produkováno stále větší množství nanomateriálů, převážně z důvodu zvyšující se poptávky po těchto materiálech. Patří sem výroba elektroniky, obalových hmot, pigmentů, kosmetických produktů, léčiv, potravin a textilií a další [20, 22]. Například nanočástice na bázi kovů, mají velké využití ve stavebnictví a automobilovém průmyslu [16]. Např. nanočástice oxidu titaničitého ( $\text{TiO}_2$ ) jsou díky svým katalytickým vlastnostem hojně využívány jako nátěrové hmoty pro vnitřní i vnější omítky [16].



K výrobě nanomateriálů se přistupuje dvěma způsoby. Prvním z nich jsou metody top-down, což znamená, že z větších celků se vytváří menší. Do těchto patří především mechanické ztracování materiálu, tedy mechanické mletí, poté např. litografie nebo mikrovlnné/ultrazvukové rozbíjení [1, 12]. Druhým způsobem pak jsou metody bottom-up, tedy z jednotlivých atomů se skládají nanostruktury. Tyto metody jsou většinou chemické a patří zde např. sol-gel, chemická depozice par (CVD), spin coating nebo růst nanomateriálů na základě chemických reakcí [1, 13].

### 2.3. Zdroje nanomateriálů

Mezi základní zdroje, ze kterých se nanomateriály do prostředí uvolňují, patří již výše zmíněné zdroje přírodní, jako jsou mořský příboj, písečné bouře, vulkanické erupce, požáry apod [22]. Antropogenními zdroji, které produkují velké množství nanočástic jsou například pyrometalurgie (mezi které patří zpracování železné rudy a výroba železa), spalování fosilních paliv a další vysokoteplotní procesy [23].

Významným zdrojem ultrajemných pevných částic jsou také některé profese. Mezi ty významnější patří svařování kovů. Při svařování se používá velmi vysoká teplota a vznikají tzv. svářecí dýmy, různého složení, dle typu svařovaného materiálu a použité techniky svařování. Například uhličitany kovů, fluorokřemičitany, chromany, dichromany, silikáty, jednoduché a složené oxidy kovů [10].

Také automobilová doprava hraje důležitou úlohu, z hlediska emisí pevných částic do prostředí. Například dieselové motory vyprodukují do prostředí velké množství mikronových a submikronových pevných částic, převážně ve formě sazí (elementární uhlík) ve velikostech okolo 50 nm [20,24]. Je již ovšem prokázáno, že také nespalovací procesy v dopravě prostřednictvím brždění (otěrem brzdových desek o brzdový kotouč) mohou produkovat částice ve velikostech okolo 20 nm. Hlavní složky těchto částic jsou saze a oxidy železa, ale i další kovové materiály [25]. V neposlední řadě také otěry pneumatik o povrch vozovky jsou zdrojem částic ve velikostech od 6 nm. Tyto částice jsou komplexem látek, převážně sloučenin zinku, organických polymerů, ale také kovů, jako jsou Li, Na, Ca, Fe a Ti.

Domácnosti jsou rovněž významnými zdroji ultrajemných (nano) částic. Například při vaření či smažení pokrmů. Dennekamp, Howarth a Dick prokázali (2001), že při vaření/smažení na elektrickém či plynovém sporáku se uvolují např. částice oxidů dusíku

do ovzduší. Při používání elektrického grilu se také uvolňují částice přímo z desek grilu [11].

Obecně kouř obsahuje mnoho ultrajemných částic, např. uhlíkaté nanotrubky, fullereny a cigaretový kouř obsahuje navíc škodlivé látky, jako jsou dehet, nebo oxid uhličitý, které nepříznivě působí na zdravotní stav [9].

## 2.4. Nanomateriály a živé organismy

Rozvoj oboru nanotechnologií s sebou přináší také možná environmentální a zdravotní rizika. Díky svým malým rozměrům mohou mikronové, ale také submikronové (nano) materiály pronikat přes vnější bariéru organismu a být transportovány v rámci organismu kamkoli do cílového orgánu. Hlavním parametrem, určujícím míru nebezpečnosti nanomateriálu, z hlediska působení na živý organismus, je expozice danému materiálu [20]. Expozici můžeme označit jako proces, kdy látka překoná vnější bariéru organismu a pronikne do něj, s následným možným vyvoláním intoxikace. Velmi důležitým faktorem, který má vliv na toxicitu nanočástic je způsob jejich vstupu do organismu [26]. Mezi základní cesty vstupu do organismu patří:

- **Inhalační expozice**

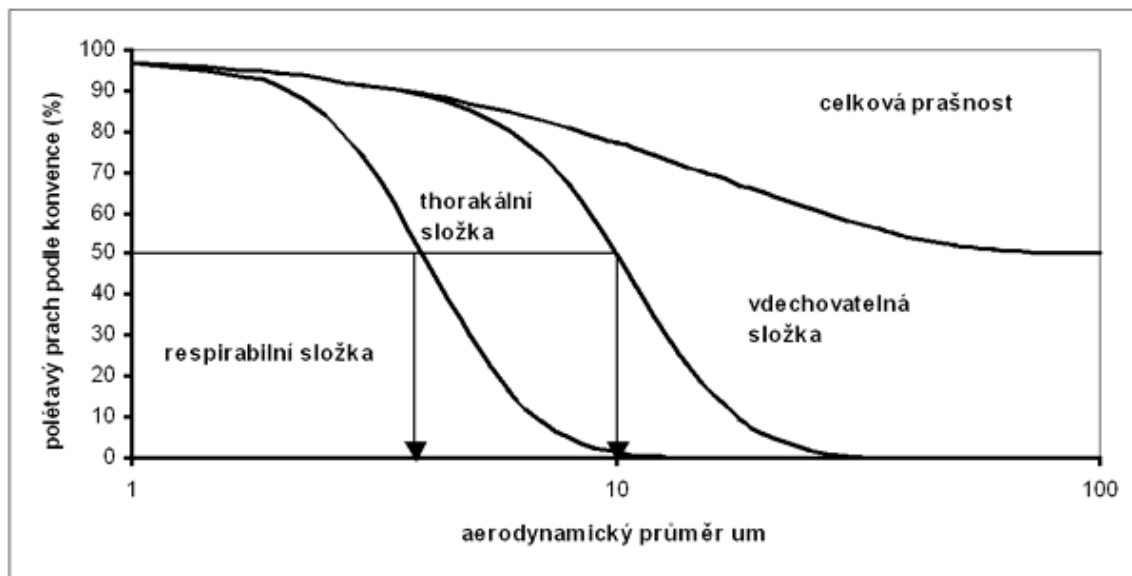
Vdechnutí je nejsnadnější a nejpravděpodobnější cesta vstupu částic do organismu. Vzduch je pro člověka nezbytný, tudíž se před tímto způsobem vstupu nanomateriálu do organismu nelze dostatečně bránit. Existují ochranné pracovní pomůcky, které se používají v pracovním prostředí při zvýšené expozici prachu v ovzduší, ty však mají většinou póry o velikosti mikrometrů, takže nanometrické částice mohou proniknout. V běžném životě se však tyto pomůcky nepoužívají. Přesto vzduch obsahuje 10 až 50 mg jemných a ultrajemných částic v jenom metru krychlovém. Denně projde plícemi člověka 10 000 až 15 000 litrů vzduchu, což znamená, že člověk denně vdechne více než 10 000 mikrobů a více než 10 miliard částic [15].

Vdechnuté prachové částice můžeme rozdělit na různé frakce, podle jejich velikosti:

**Inhalovatelná frakce** ( $< 100 \mu\text{m}$ ) - částice, které jsou schopny vstoupit do dýchacího traktu nosem nebo ústy.

**Thorakální frakce** ( $< 10 \mu\text{m}$ ) - částice, které mohou po vdechnutí pronikat až za hrtan.

**Respirabilní frakce** ( $< 5 \mu\text{m}$ ) - částice, které mohou po vdechnutí pronikat do dýchacích cest, kde již není řasinkový epitel a mohou být transportovány až do alveolární části plic, tj. do plicních sklípků [51].



Obrázek 2: Vdechovatelná, thorakální a respirabilní konvence jako procenta z polétavého prachu. 50% polétavého prachu s  $D = 10 \mu\text{m}$  ( $D$  = aerodynamický průměr částice) je v thorakální frakci a 50 % polétavého prachu s  $D = 4 \mu\text{m}$  je v respirabilní frakci. Převzato a upraveno dle [51].

Plíce se skládají ze dvou různých funkčních oblastí. První je dýchací ústrojí, které slouží k proudění vzduchu dovnitř a patří zde dutina nosní, vedlejší nosní dutiny a hltan [39]. Do druhé oblasti, která slouží k výměně plynů, patří průdušky, průdušinky a plicní sklípky, kde dochází k výměně oxidu uhličitého za kyslík. Lidské plíce se skládají z přibližně 2300 km dýchacího ústrojí a přibližně 300 milionů alveolů, povrch plic je pak téměř  $140 \text{ m}^2$  a představuje tak velký expoziční povrch [15]. Respirační trakt funguje jako robustní bariéra z epiteliální vrstvy, která brání pronikání částic do plicní tkáně. V oblasti výměny plynu je bariéra mezi alveolární stěnou a kapilárami velmi tenká. Větší částice jsou bariérou zastaveny a dále do plic neproniknou. Oproti tomu, nanometrické částice bariérou pronikají a mohou se pak ukládat do epitelu v alveolech. Nanočástice mohou také volně prostupovat buněčnou stěnou, dále do krve, a tím pádem do celého těla [14, 15].

Zatím není známo, jak dlouho jsou částice v epitelu alveolů uloženy, ale odhaduje se, že to může být i několik měsíců. Uvádí se také spojitost těchto deponovaných částic s různými respiračními onemocněními [14].

- **Perorální expozice**

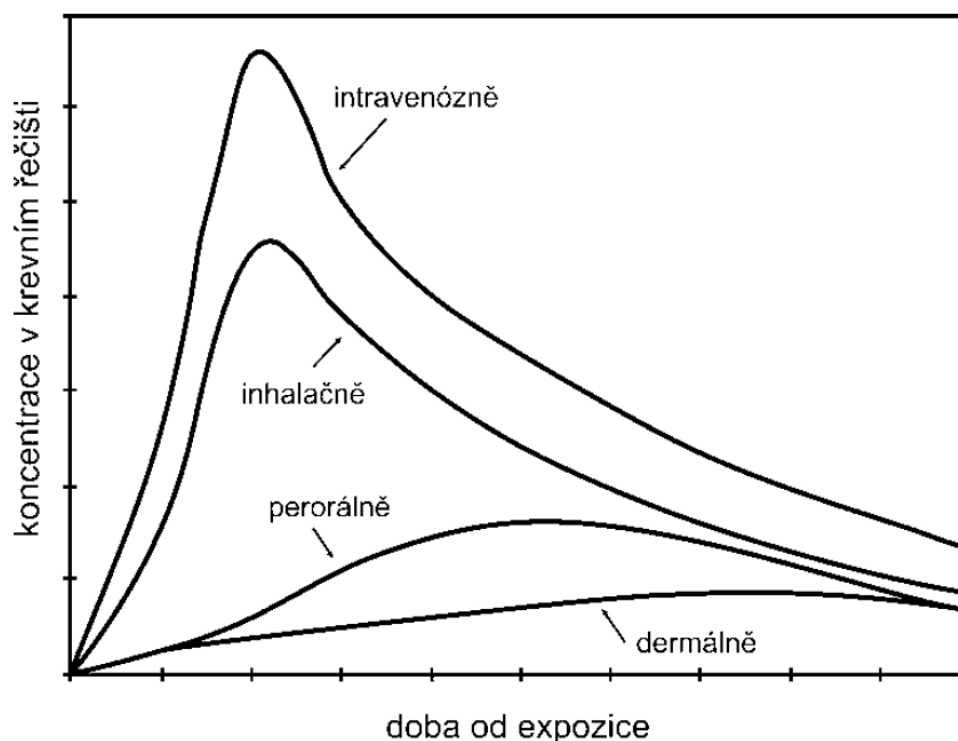
Celý gastrointestinální trakt je v přímém kontaktu se všemi požitými materiály a veškeré nezbytné živiny pro tělo jsou zde absorbovány. Celá plocha gastrointestinálního traktu slouží jako složitá bariéra. Plní různé funkce, umožňuje pronikání makromolekul živin, které člověk potřebuje a zároveň umožňuje malým molekulám difúzi skrz epitel žaludku. Stěny střev slouží k absorpci živin z přijímané potravy [14, 15].

Mikronové a submikronové částice mohou být do těla vpraveny potravou, kterou konzumujeme nebo polykáním vzduchu. Počet nano- a mikročástic, které člověk přijme ústy, se odhaduje okolo  $10^{12}$  až  $10^{14}$  denně, přičemž převážnou většinou jsou to částice na bázi křemičitanů a oxidů titanu [14]. V experimentech se zvířaty bylo pozorováno, že polyesterové nanočástice velikosti 50 až 100 nm jsou stěnami střev absorbovány do lymfatického systému, ale naopak fullerény (molekuly tvořeny atomy uhlíku uspořádaných do vrstev z pěti- a šestiúhelníků, které jsou svinuty do uzavřeného tvaru) absorbovány nejsou [15]. Jiné studie však žádné vstřebávání submikronových částic prostřednictvím gastrointestinálního traktu (GIT) neprokázaly. Nelze tedy jednoznačně prokázat, že prostřednictvím GIT dochází ke vstřebávání částic submikronových rozměrů (nanočástic) [14, 15].

- **Dermální expozice**

Další cestou, která umožňuje vstup nanomateriálů do lidského organismu, je kůže. Kůže je velmi dobrou bariérou proti nepříznivým vlivům prostředí, výjimkou je sluneční záření, které nám poskytuje vitamin D.

Kůže pokrývá celé lidské tělo, tudíž je velmi exponována. Průměrná hodnota plochy, která tvoří lidskou kůži, je 1,5 až 2 m<sup>2</sup>. Kůže se skládá ze tří základních částí, jsou jimi pokožka, škára a podkožní vazivo. Nejsvrchnější část pokožky je tlustá cca 10 μm a tvoří ji odumřelé zrohovatělé buňky. Existuje však konsens, že průnik nanočástic kůži je možný [14].



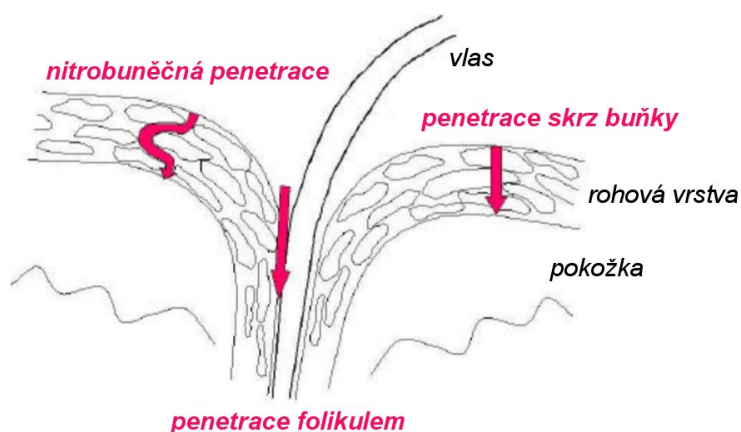
Obrázek 3: Rychlost změn koncentrace látky v organismu při různé expozici [20].

## 2.5. Osud a vliv nanočástic v těle

Nanočástice, které se do lidského těla mohou dostat prostřednictvím již zmíněných expozic, se mohou dále podílet na různých změnách normální funkce lidského organismu. To, jaký vliv mají nanočástice na lidský organismus a tělo je stále ve fázi výzkumu [20].

Za nejbezpečnější expozici nanočástic je považována dermální expozice, avšak i přesto byl vypořádován průnik především částic lipofilní povahy. Ty nejlépe pronikají žlázami, podél vlasů a chlupů nebo mohou proniknout všemi vrstvami kůže [28]. Oproti tomu, iontové sloučeniny nebo látky nerozpustné ve vodě bariérou kůže nemohou kůži proniknout. Existují tři způsoby penetrace nanočástic přes kůži, a to intercelulární, folikulární a transcelulární. Největší nebezpečí by hrozilo, kdyby nanočástice kůži pronikly epidermem až k cévnímu zakončení v dermis, tak by se mohly dostat až do krevního řečiště a následně dále do organismu. Není však předpoklad, že by množství nanomateriálů se schopnosti takto pronikat bylo významné [20]. Zkoumány byly především nanočástice  $\text{TiO}_2$  a  $\text{ZnO}$ , které se ve velké míře používají v kosmetických přípravcích, zejména pak v opalovacích krémech pro svou schopnost absorpce UV záření. Bylo pozorováno, zda tyto nanočástice pronikají do horních vrstev pokožky a vstupují do podkladové tkáně. K dnešnímu dni se takové tvrzení nepotvrdilo, nicméně existují náznaky, že se takové částice mohou hromadit kolem kořínků vlasů v tzv. folikulech. To by bylo možné, jelikož folikuly jsou při růstu vlasů otevřeny a tudíž je proniknutí nanočástic možné [14, 15].

Žádný vstup nanočástic do krve přes zdravou kůži nebyl doposud prokázán. Ryman-Rasmussen a kol. (2006) však prokázaly, že kvantové tečky mohou do kůže proniknout [52]. Stále však probíhá výzkum zaměřený na to, zda se pohlcování částic liší u zdravé a porušené kůže.



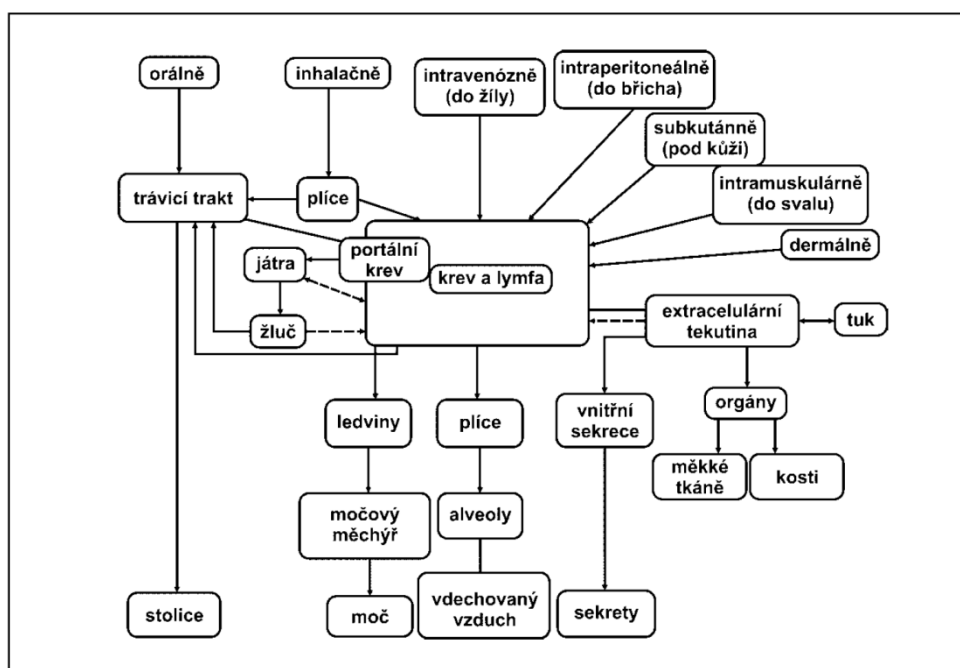
Obrázek 4: Dermální expozice. Převzato a upraveno dle [20].

Nejsnadnější a nepravděpodobnější expozicí je inhalační expozice. Nejmenší riziko představují částice větší než 10  $\mu\text{m}$ , ty jsou zachyceny v horních cestách dýchacích. Odkud se mohou z těla dostat vykašláním nebo vysmrkáním, v opačném případě však mohou být spolknuty [20]. Částice o velikostech 4 až 10  $\mu\text{m}$  se dostávají pod úroveň hrtanu do dolních cest dýchacích a částice velké okolo 2,5  $\mu\text{m}$  mohou snadno proniknout až do průdušek [28]. Největší riziko představují částice velké 1 až 3  $\mu\text{m}$ , zejména pak částice vláknitého tvaru. Tyto částice se snadno usazují v průduškách, setrvávají zde dlouhou dobu a mohou vyvolávat různá onemocnění, včetně rakoviny plic (viz azbest) [20, 28]. Nejmenší částice o velikostech řádově desítek až stovek nanometrů pronikají až do plicních sklípků, odtud mohou s plyny odejít do krevního oběhu [21]. Až třetina všech částic s velikostí pod 100 nm je deponována v alveolární oblasti plic (plicní sklípky). Při dýchání nosem se částice zachycují také v horních cestách dýchacích a také se tím snižuje pronikání částic velikostí okolo 3  $\mu\text{m}$  do dolních cest dýchacích.

Tělo se však proti těmto cizorodým látkám brání a snaží se je z těla eliminovat. Využívá k tomu několik obranných mechanismů. V plicích se samotná eliminace částic děje dvěma způsoby. Prvním z nich je tzv. „chemické vyčistění“, které může probíhat přes dýchací trakt a vykazuje různou účinnost v závislosti na vnitřním a vnějším prostředí, zejména pak na pH. Druhým způsobem čištění je fyzikální translokace, která je oproti chemickému čistícímu procesu více vázána na oblast dýchacího traktu. Mezi fyzikální translokaci patří eliminace tzv. „hlenovým eskalátorem“, který díky svému řasinkovému epitelu posune hlen obsahující inhalované částice k hltanu, a tím zabráni jejich dalšímu proniknutí do dýchacích cest nebo fagocytóza alveolárními makrofágy, která probíhá v alveolární části plic. Alveolární makrofágy jsou schopny pohltit částice pomocí fagocytózy, s nimi pak cestují směrem k hlenovému eskalátoru. Jedná se o nejúčinnější odstraňování nanočástic z lidského organismu, makrofágy dovedou totiž cíleně vyhledat deponované nanočástice na základě jejich chemické afinity. K odstranění nanočástic z těla také může dojít epiteliální translokací, to znamená jejich průnik z dýchacího traktu do krevního a lymfatického systému nebo translokací smyslovými neurony, zejména zakončením čichového nervu v nosní sliznici [20].

Nanočástice se objevují také v trávicím ústrojí člověka. Část nanočástic, které se v trávicím traktu nacházejí, mají původ v dýchacím ústrojí, odkud jsou vypuzeny „hlenovým eskalátorem“ a následně spolknuty. V malém množství se zde také mohou vyskytovat přímo vdechnuté nanočástice. Závislost absorpce částic v trávicím traktu je

ovlivněná jejich velikostí, a to tak, že s rostoucí velikostí částice jejich absorpce klesá [28]. Největší plochu, kterou mohou nanočástice prostupovat je stěna střeva. Stěny střeva jsou pokryty jednovrstevným epitelem tvořeným enterocyty a pohárkovými buňkami, oba typy buněk jsou těsně spojeny a tím zajišťují účinnou bariéru pro paracelulární přenos. Enterocyty kontrolují přenos makromolekul a mikroorganismů se živinami. Pohárkovité buňky produkují ochrannou viskózní tekutinu (hlen), a tím chrání sliznici před penetrací toxinů, bakterií a antigenů. Na střevní sliznici jsou rozmístěny místa, tzv. Peyerovy pláty, jsou to nahromaděné organizované lymfatické tkáně a intraepiteliální lymfocyty. Povrch je pokryt plochými M-buňkami, které mohou transportovat patogenní mikroorganismy a velké molekuly přes cytoplazmu až do krve či mízy, kde se mohou dostat do kontaktu s makrofágy a lymfocyty Peyerových plátů. Vstup nanočástic může potencionálně probíhat přes M-buňky, jelikož mají velkou kapacitu pro přenos. Obecně mohou být částice menší než 1  $\mu\text{m}$  fagocytovány M-buňkami a transportovány do bazálního regionu, částice větší než 5  $\mu\text{m}$  jsou také fagocytovány, ale zůstávají lapeny v Peyerových plátech [20]. Kinetika částic v trávicím traktu závisí na elektrostatickém náboji částice, kladně nabitě částice jsou v záporně nabitě sliznicové vrstvě zadržovány, naopak záporně nabitě nanočástice sliznicovou vrstvou pronikají [28,29]. Yamago a kol. (1995) se zabývali studií metabolismu nanočástic z perorální expozice, prokázali jejich rychlé vyloučení stolicí, a to do 48 hodin, většina zbylých nanočástic byla poté vyloučena také močí. V některých studiích je však uvedeno, že některé nanočástice se mohou dostat do krve, sleziny, jater, kostní dřeně, lymfatických uzlin, ledvin plic a mozku [29].



Obrázek 5: Přehled osudu nanočástic v celém těle [28].



Na obrázku (Obrázek 5) jsou znázorněny možné expozice nanočástic a jejich následné působení v lidském těle. Nanočástice jsou stotisíckrát menší než buňky lidského těla, díky tomu jsou schopny překonávat různé biologické bariéry a migrovat tak do různých míst. Nejmenší bariéru pro nanočástice tvoří paradoxně plíce, rychlost proniknutí nanočástic do krve (blood cell barrier) současně závisí také na materiálu, kterým jsou nanočástice tvořeny [28]. Po inhalaci mohou částice projít krom krve také po axonech nervových buněk do centrální nervové soustavy nebo přes buňky epitel a sliznici gastrointestinálního traktu [20].

Proniknou-li nanočástice do krevního oběhu, mohou jako viry postupně proniknout až do buněk, a tím může být narušen či nějak pozměněn metabolismus buňky. Může však také dojít k jejich dlouhodobému ukládání v některých orgánech. Z tohoto hlediska jsou nejvíce ohroženy orgány, které jsou nejvíce zásobovány krví, jako jsou játra, slezina, srdce či mozek, u těchto orgánů lze tedy předpokládat nejzávažnější poškození [28]. Kardiovaskulární systém může být ovlivněn nanočásticemi z ovzduší, přesnější mechanismy však známy nejsou a neexistují konkrétní důkazy o tom, že by toto riziko vznikalo u vyrobených nanočástic [27]. Nanočástice, které projdou buněčnou membránou, mohou mít za následek genetické změny buněk v lidském těle a poškození DNA [20,27]. Geny mohou být ovlivněny uvnitř buňky přímo nebo způsobenými záněty. Pokud nanočástice získá bílkovinný povlak, může díky němu proniknout do tkáně nebo přeskočit hraniční membránu kolem buňky či jaderné membrány kolem DNA buňky. Poškození DNA bylo prokázáno přítomností nanočástic zlata. U některých vyráběných nanomateriálů testovaných na buňkách byly zaznamenány škodlivé genetické účinky, spojeny především s produkcí volných radikálů. Poškození může zahrnovat poškození DNA, mutace genů nebo chromozomální změny [27]. Buněčnou neurózu mohou způsobit karboxyfullereny [30] a také bylo dokumentováno (Hwang, 2008), že nanočástice zlata způsobily oslabení membrány s následným tepelným šokem u *Escherichia coli* [31]. V případě uhlíkových nanotrubiček se hovoří o jejich podobnosti s azbestovými mikrovláknami, je tedy možná jejich souvislost se vznikem rakoviny [27].

Nanočástice však mohou pronikat organismem až do reprodukčního systému a tím ovlivňovat jeho funkci. Prozatím byly pozorovány především akumulace nanočástic v reprodukčních orgánech samců a samic zvířat, hlavně myši a potkanů [31, 32]. Vzhledem k tomu, že je fyziologie těchto zvířat lidem velmi podobná, předpokládá se podobné chování také v lidském reprodukčním systému. U zkoumání samicích reprodukčních

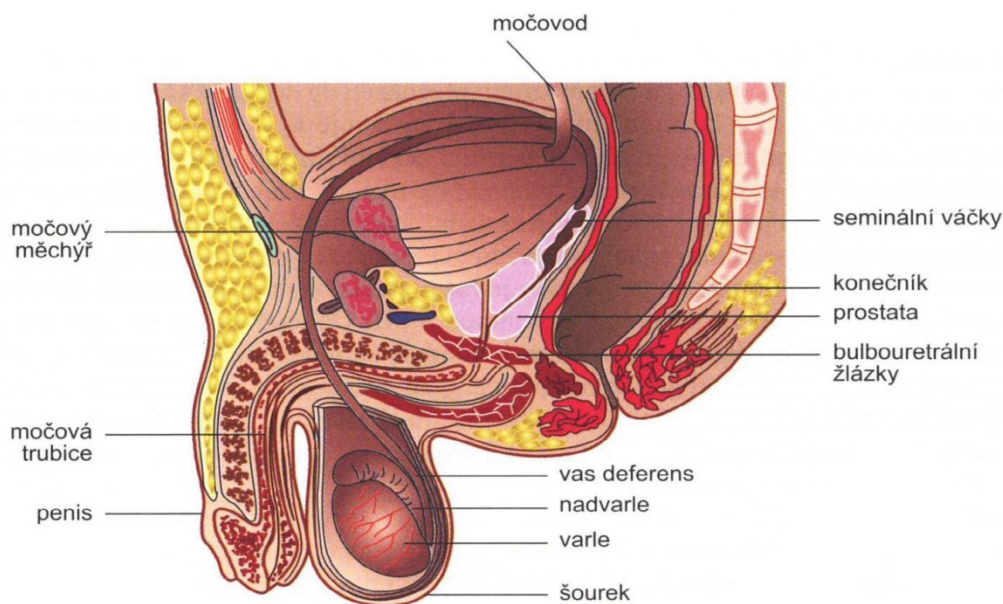
orgánů existují důkazy, které naznačují, že menší nanočástice se v děloze hromadí více než nanočástice větší. Není však dokázána toxicita těchto částic. [32]. Bylo však prokázáno narušení vývoje oocyty, a to napadáním jejich ochranné bariéry, granulózních buněčných vrstev a zony pellucida (glykoproteinový obal vajíček savců). Některé nanočástice mohou placentou prostoupit do plodu pasivní difúzí nebo endocytózou, tím může být vyvolán zánět plodu, genotoxicita, apoptóza, cytotoxicita, reprodukční nedospělost, poškození nervového systému či imunodeficience [33, 34]. Toxicita nanočástic závisí na jejich velikosti, tvaru, dávkování, náboji, materiálu a povrchu. Nanočástice také ovlivňují sekreci hormonů, v reprodukčním systému ženy třeba tím, že ničí sekreční buňky ve vaječnících. U myši byl prokázán pokles těhotenství v souvislosti s expozicí nanočástic. U potkanů pak byly pozorovány přenosy nanočástic stříbra z matky na potomky jak placentou, tak také mateřským mlékem [33]. Blum a kol. (2012) provedli výzkum, při kterém pozorovali vliv nanočástic oxidu kadmenného (CdO) na těhotné myši samice. Studie ukázala, že inhalace CdO během těhotenství nepříznivě ovlivňuje reprodukční plodnost a mění se fetální a postnatální růst potomků [35].

Vliv nanočástic na samičí a ženský reprodukční systém je vědci zkoumán v daleko větší míře než vliv na mužský reprodukční systém. To je důvod, proč se tato práce na vliv nanočástic na mužský reprodukční systém zaměřila.

Vliv nanočástic na samčí reprodukční systém byl zkoumán především na samcích krys a myši. U zvířat bylo pozorováno nevratné poškození varlat [32]. Yoshida a kol. (2009) zkoumali vliv uhlíkatých nanočástic na samčí reprodukční systém. Bylo zjištěno, že vliv uhlíkatých nanočástic závisí spíše na hmotnosti částice než na jejich počtu [36].

## 2.6. Mužský reprodukční systém

### 2.6.1. Základní anatomie



Obrázek 6: Anatomie mužského pohlavního ústrojí. Převzato a upraveno dle [37].

Mužský reprodukční systém se skládá z vnějších a vnitřních pohlavních orgánů. Vnitřní pohlavní orgány se také nazývají pomocné. Mezi zevní pohlavní orgány muže se řadí pyj s částí močové trubice a šourek [38].

**Pyj** – latinsky penis je kopulační orgán, ve kterém jsou topořivá tělesa pokrytá jemnou kůží, ta je více pigmentovaná než běžně na těle [39,40]. Při naplnění topořivých těles krví dochází k jejich zduření a nastává erekce [38]. Na penisu rozlišujeme tři hlavní části, a to kořen penisu (radix penis), který je fixován na spodní pluchu k ramenům stydkých kostí [39], poté tělo penisu (corpus penis), to je volné a distálně zakončeno kuželovitým rozšířením v třetí část, která se nazývá žalud (glans penis). Žalud je překryt volnou kůží, předkožkou [38].

**Šourek** – latinsky scrotum tvoří vak pro varlata (testes), nadvarlata (epididymmis) a semenné provazce (funiculi spermatici) [38], je zavěšen za kořenem penisu. Šourek je hruškovitého tvaru a tvoří jej kůže a podkožní vazivo. Střední, sagitální postavená vazivová překážka (septum scroti) jej rozděluje na dvě samostatné dutiny, v obalu mají obě dutiny (cavum scroti) uložené varle [39]. Kůže šourku je silně pigmentována, porostlá chlupy a nachází se zde mnoho potních a mazových žláz [38].

Vnitřními pohlavními orgány se nazývají varlata, nadvarlata, chámovody, semenné vázky a vstřikovací kanálky a žláza předstojná. Probíhá zde také část močové trubice [38].

**Varlata** – latinsky testes jsou párovou mužskou pohlavní žlázou uloženou v šourku (scrotum). Tvar varlat je elipsoidní, ze stran mírně zploštělé [39]. Pod epiorchiem (serosní kryt varlete) je tuhý vazivový obal (tunica albuginea), od něhož odstupují přepážky (septula testis) a tím se varle rozděluje na 200 – 300 lalůček (lobuli testis). V lalůčkách se nacházejí semenotvorné kanálky vystlané zárodečným epitelem, ve kterém vznikají spermie [38]. Levé varle bývá větší než pravé a je uloženo cca o 1 cm níže [39]. Ve varlatech jsou uloženy intersticiální Leydigovy buňky, které produkují mužský pohlavní hormon, testosteron [38].

**Nadvarlata** – latinsky epididymis jsou provazce uložené na zadní ploše varlat [38] a spolu s varlaty jsou pokryty epiorchiem [39]. Rozlišuje se zde kraniálně uložená hlava (caput epididymis), tělo (corpus epididymis) a ocas nadvarlete (cauda epididymis). Ocas nadvarlete se při konci varlete ostře otáčí kraniálně a přechází do chámovodu (ductus deferens) [38]. Do nadvarlat přecházejí dozrálé spermie uvolněné z varlat, dostávají se zde do prostředí kyselého sekretu s pH 6,48 – 6,61. Kyselá reakce zastaví pohyblivost spermií, tím zůstává energie spermií nevyčerpaná. Nedochází však k negativnímu účinku kyselého prostředí, protože spermie jsou chráněny koloidním obalem [39].

**Chámovod** – latinsky ductus deferens je svalová trubice dlouhá 35 až 40 cm a široká 3 mm. [38]. Chámovod spojuje nadvarle s močovou trubicí [39]. Při ejakulaci se chámovodem přenášejí spermie do močové trubice. Tříselným kanálem se chámovod dostává do dutiny břišní, zahýbá na zadní stěnu močového měchýře a kříží se s močovodem. Poté se spojuje s vývodem semenných váček a jako vstřikovací trubička (ductus ejaculatorius) vyúsťuje do prostatické části mužské močové trubice [38].

**Provazce semenné** – latinsky funiculus spermaticus jsou svazky, které doprovází a obklopují chámovod, a to od jeho výstupu z ocasu nadvarlete až do průchodu inguinálním kanálem [39].

**Semenné vázky** – latinsky vesiculae seminales jsou párové přídatné žlázy mužského pohlavního systému. Vznikají jako vychlípení z konce ampulárního úseku chámovodu, mají protáhlý tvar a jsou uloženy šikmo laterokraniálně vzhůru za zadní stěnou močového měchýře. Tvar žláz je často asymetrický a jejich vzhled je hrbolatý [39]. V cylindrických buňkách sliznice je produkován alkalický sekret, který je součástí ejakulátu, neutralizuje kyselé prostředí pochvy a umožňuje tak pohyb spermií [38].

**Předstojná žláza** – latinsky prostata je přídatná pohlavní žláza uložená kolem začátku močové trubice, těsně pod močovým měchýřem. Prostata má tvar komolého, předočně mírně zploštělého kužele, obráceného bází vzhůru k měchýři [39]. Jejím obalem je vazivo (capsula propria) a je obklopená žilní pletení (plexus venosus prostaticus). Prostata je hmatná přes zadní stěnu rekta (per rectum) ve výši Kohlrauschovy řasy [38].

**Mužská močová trubice** – latinsky urethra masculina je dlouhá 20 až 22 cm, začíná v močovém měchýři jako vnitřní ústí močové trubice (ostium urethrae internum) a končí jako zevní ústí močové trubice (ostium urethrae externum) na vrcholu žaludu (glans penis). Močová trubice je u muže nejen vývodnou cestou močovou, ale také vývodnou cestou pohlavní [38,39].

#### 2.6.2. Fyziologie mužského pohlavního ústrojí

K oplození ženského vajíčka jsou nutné mužské pohlavní buňky, spermie. Spermie vznikají v mužském pohlavním ústrojí, konkrétně ve varlatech. Vývoj spermií se nazývá spermiogeneze a je to proces množení, redukčního dělení, dozrávání a tvarové změny nediferencovatelných zárodečných buněk. Výsledkem spermiogeneze jsou tvarované, funkčně diferencované a oplození schopné mužské pohlavní buňky, spermie. Pohlavně zralé varle obsahuje okolo 1 miliardy spermiogonií a předpokládá se, že každou hodinu varle opustí zhruba 1 milion spermií. Proces spermiogeneze trvá 74 dní, poté spermie putují kanálky do nadvarlete. Nadvarletem procházejí 8 – 17 dní a teprve poté mohou být součástí ejakulační tekutiny. To znamená, že zralá spermie se může uplatit nejdříve po 82 dnech od začátku vývoje spermiogonie [39].

Celkové množství ejakulátu je 2 – 5 ml, pokud je však množství menší než 2 ml, mohou se objevit problémy s neplodností. Samotné spermie tvoří pouze 5 – 15 % objemu ejakulátu, přičemž normální objem spermií je 2 – 3 ml. Ejakulát se skládá z jednotlivých příspěvků více reprodukčních orgánů. Největším množstvím přispívají semenné vajíčky, a to přibližně 65 – 70 % složením ejakulátu. Semenné vajíčky produkují viskózní tekutinu, která je nažloutlá a je bohatá na fruktózu, dále obsahuje také citrát, aminokyseliny, enzymy a flavin. Množstvím 25 – 30 % přispívá k ejakulátu prostata, prostatický sekret obsahuje kyselinu citronovou, specifický prostatický antigen, proteolytické enzymy, vápník, hořčík a zinek. Zinek má funkci stabilizace chromatinu, který obsahuje DNA ve spermiích, nedostatek zinku poté může vést k nižší plodnosti. Další příspěvek ejakulátu je poskytnut varlaty, konkrétně je to 2 – 5 %. Varlata produkují 200 – 500 ml spermií. Posledním

příspěvkem je hlen z bulbouretrální žlázy, ten tvoří méně než 1 % obsahu ejakulátu. Produkovaný hlen je důležitý pro mobilitu spermií v děložním čípku a v pochvě [41].

Kromě spermií se v ejakulátu nachází mnoho jiných látek, které mohou spermiím dodat potřebnou energii. Ejakulát obsahuje prostaglandiny, které jsou důležité k potlačení ženského imunitního systému proti spermiím a tím pomáhají k usnadnění oplození. Mezi základní složky ejakulátu patří bílkoviny, které tvoří zhruba polovinu hmotnosti jeho obsahu. Většina bílkovin nacházejících se v ejakulátu pochází ze semenných váčků, ačkoli albumin, který tvoří asi třetinu obsahu bílkovin, je převážně prostatického původu (Hirsch a kol, 1991). Podstatnou složku ejakulátu tvoří také ionty. Vápník je zde v iontové formě zastoupen jen z malé části (2 – 4 %). Dalšími důležitými ionty jsou hořčík, draslík, sodík a zinek. Tyto ionty snadno tvoří komplexy s jinými složkami ejakulátu, hořčík a zinek se poté mohou také s jinými molekulami navázat na povrch spermií. Zinek je vylučován z prostaty jako nízkomolekulární komplex s citrátem. Další důležitou složkou ejakulátu jsou sacharidy, konkrétně fruktóza a glukóza. Koncentrace fruktózy se mění s věkem a je důležitým zdrojem energie pro spermie. Zdrojem energie je také glukóza, a proto je v ejakulátu zastoupená ve vysoké koncentraci. V ejakulátu se nacházejí další různé látky, a to močovina a lipidy ve stopových množstvích poté také např. kyselina askorbová nebo kreatin [41].

Počet spermií v jednom mililitru je velmi individuální, v rozmezí 20 – 300 milionů. Tento počet je považován za normální, pokud je spermií pod 10 milionů, je to považováno za problém [42]. V dnešní době počet spermií v ejakulátu rapidně klesá. Zdraví muži mají přibližně 20 až 30 milionů spermií, vzorky s 60 miliony jsou už raritou [43]. Neplodnost je způsobená nejčastěji nedostatečným počtem spermií, problémy s ejakulací nebo deformacemi spermií. Abnormality spermatu mohou být způsobeny zánětem varlat, zduřelými žilami v šourku nebo abnormálně vyvinutými varlaty. Snížený počet spermií může být způsoben příušnicemi v pubertě, hormonální poruchou, vystavení záření nebo jedovatým chemikáliím, požití alkoholu, tabáku nebo jiných drog nebo např. nošení těsného spodního prádla [42]. Problémy s ejakulací mohou být způsobeny např. erektilní dysfunkcí, poškozením nervů, předčasnou ejakulací nebo některými léky [44]. Nejčastějším důvodem neplodnosti je deformace spermií. Přibližně 70 % všech případů neplodnosti je způsobeno špatnou pohyblivostí spermií a vysokým podílem abnormálních spermií [43].

### 2.6.3. *Fragmentace DNA spermií*

Až 25 % neplodných mužů s malou mobilitou a špatnou morfologií spermií mívá zpravidla vyšší hladiny fragmentované DNA než jedinci s normálními parametry semene. Fragmentace DNA je charakterizována zlomy jednoho nebo obou vláken DNA, často přítomných v ejakulátu subfertilních mužů [53,54]. Často i nevysvětlitelnou neplodnost u mužů s normální pohyblivostí a morfologií spermií může způsobovat vyšší stupeň fragmentace DNA. Buňky spermatu, které mají porušenou DNA, buď neoplovní buňku vajíčka, nebo v případě oplodnění dojde k selhání ve správném vývoji embrya a samovolnému potratu [55].

### 2.6.4. *Vliv nanočástic na mužský reprodukční systém*

Reprodukční orgány mužů mohou obsahovat i pevné částice. Doposud se nejvíce zkoumají účinky nanočástic stříbra (AgNP). AgNP jsou hojně využívány pro své antibakteriální vlastnosti, ať už to v lékařství nebo třeba v oděvním průmyslu. Ve studiích (Gromadzka a kol, 2012) byly zjišťovány účinky AgNP na epididymální spermie (spermie v nadvarlatech, které nejsou schopné pohybu a oplodnění vajíčka) u potkanů. Tato studie se zaměřila na akutní účinky jednorázově intravenózně podaných AgNP o různých rozměrech (20 nm a 200 nm), v různých dávkách (5 a 10 mg/kg tělesné hmotnosti) a v závislosti na čase (24 h, 7 a 28 dní). Výsledky této studie ukázaly, že intravenózní expozice AgNP do těla krys nezpůsobila změnu tělesné hmotnosti, ani nijak neovlivnila příjem potravy, to znamená, že nedochází k výrazné toxicitě. Důležitým zjištěním této studie je to, že 20 nm AgNP způsobily poškození DNA v zárodečných buňkách. DNA byla zkoumána kometovou metodou (z ang. the comet assay). Nejvyšší míra poškození byla vysledována po 24 hodinách od injekce, po 7 a 28 dnech bylo poškození DNA nižší. Předpokladem je, že AgNP byly postupně z organismu vyloučeny a došlo k opravám DNA. I přes nedostatek změn v množství a rozložení tělesné hmotnosti byly zaznamenány významné morfologické změny varlat, jako je zvýšený průměr a zvýšený průměr semenných kanálků. Tyto změny nastaly po 28 dnech, u zvířat ošetřených 200 nm. Tato studie tedy ukázala, že i malé množství 20 nm AgNP podaných intravenózně má toxický účinek na zárodečné buňky, jako je snížení počtu spermií a poškození DNA [45].

Další poznatky o toxicitě AgNP byly zjištěny Wangem a kol (2017), kdy byly pozorovány změny lidského spermatu. V této studii byly lidské spermie exponovány různými dávkami AgNP (0,5 µg/ml; 100 µg/ml; 200 µg/ml a 400 µg/ml) po různé časy (15, 30 a 60 min). Následně byla použita metoda transmisní elektronové mikroskopie

(TEM) ke zkoumání ultrastrukturálních charakteristik spermií. Výsledky ukázaly, že pokles životaschopnosti a pohyblivosti spermií je závislý na dávce a čase, byl také zároveň zjištěn zvýšený poměr abnormálních k normálním spermiím po 30 a 60 minutách expozice AgNP při 200  $\mu\text{g/ml}$  a 400  $\mu\text{g/ml}$ . Nejčastější abnormality se týkaly hlav spermií, kdy došlo k narušení chromatinu, a chyběly akrozomy nebo byly ohnuté konce spermií či zakřivené jejich střední části. Ultrastrukturní charakteristiky spermií poté zjistily poškození, zduřené, granulární a vakuolární defekty chromatinu [46]. Moretti a spol. (2012) prováděli také studii týkající se AgNP a bylo zjištěno, že k toxicitě AgNP dochází pouze při vyšších koncentracích. Tak vysoké koncentrace se s největší pravděpodobností netýkají expozice člověka. Avšak nejsou doposud jednoznačné informace o toxicitě AgNP [47].

Stříbrné nanočástice však nejsou jedinými běžně používanými nanočásticemi. K významným nanočásticím patří také oxid titaničitý ( $\text{TiO}_2\text{NP}$ ), který je používán v kosmetice, opalovacích krémech či barvách. Gao a spol. (2013) provedli studii na myších, kdy bylo myším samcům podáno intragastricky různé množství  $\text{TiO}_2\text{NP}$  (2,5; 5 a 10 mg/kg tělesné hmotnosti) po dobu 90 dní. Bylo prokázáno, že  $\text{TiO}_2\text{NP}$  mohou překročit bariéru varlat a hromadit se v nich, což má za následek testikulární léze, malformace spermií a změny hladin pohlavních hormonů. Mikroskopickou analýzou byly zjištěny také změny genů podílejících se na spermatogenezi. Akumulace  $\text{TiO}_2\text{NP}$  způsobila patologické změny varlat, výrazné snížení koncentrace spermií, pohyblivost spermií a zvýšení abnormalit spermií. Výsledky naznačují, že dlouhodobá expozice nižších dávek  $\text{TiO}_2\text{NP}$  může způsobovat problémy, proto je třeba pečlivě sledovat aplikaci  $\text{TiO}_2\text{NP}$  v různých oblastech a jejich produkci mužskými pracovníky [48].

Hovoří se o toxickém účinku nanočástic ZnO (ZnO NP) na spermie. Barkhordari a spol. (2013) se ve své studii zaměřili na ZnO NP a mužské spermie. V této studii byl zkoumán účinek ZnO NP na lidské spermie, které byly získány a analyzovány podle WHO. Vzorky pocházely od 15 zdravých mužů a byly vystaveny různým koncentracím ZnO NP (10, 100, 500 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) při teplotě 37 °C po dobu 45, 90 a 180 minut. Procento úmrtnosti spermií bylo zjištěno MMT testem, pro srovnání a koncentraci byl poté použit Mann – Whitneyův test. Výsledkem bylo zjištění, že maximální úmrtnost buněk po 45, 90 a 180 minutách byla 20,86 %, 21,2 % a 33,26 %. Lze tedy vypožorovat, že úmrtnost s časem rostla. Ve všech inkubačních časech byla zjištěna nejvyšší úmrtnost buněk při koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  a nejnižší u 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ve srovnání s toxicitou AgNP a  $\text{TiO}_2\text{NP}$  je toxicita ZnO NP u spermií mírná. Toxicita ZnO NP roste s dávkou a časem [49].



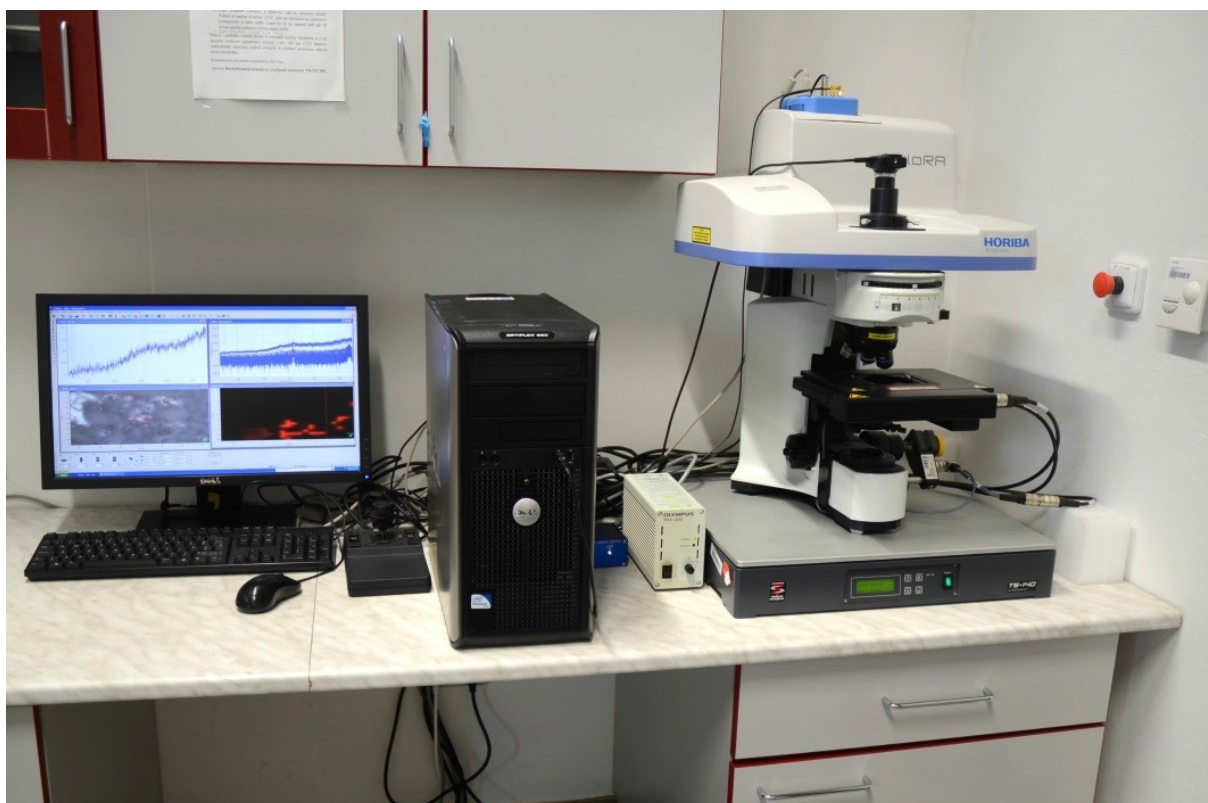
### 3. PRAKTICKÁ ČÁST

#### 3.1. Použité přístroje

##### 3.1.1. Ramanův mikrospektrometr

K analýze vzorků byl použit Ramanův konfokální mikroskop XploRA<sup>TM</sup> (HORIBA Jobin Yvon, France), kdy vorek nepotřeboval žádnou další úpravu.

Ramanova mikroanalýza byla provedena systémem Smart Raman XploRA<sup>TM</sup> (HORIBA Jobin Yvon, Francie), (Obrázek 7), a to v celém rozsahu vlnočtu  $100 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ . Použit byl objektiv se zvětšením 100 x, ten je vhodný pro vzorky, které jsou v podobě tenkých vrstev nebo zaschlých tekutin na podložním sklíčku. Použit byl laser o vlnové délce 532 nm s excitačním laserovým zdrojem 20 – 25 mW. Laserový svazek má průměr přibližně 500 nm, to již umožňuje bodovou analýzu částic a shluků částic. U zařízení XploRA<sup>TM</sup> je možné zvolit intenzitu laserového paprsku v rozmezí 0,1; 1; 10; 25; 50 a 100 %. Nastavení mřížky bylo 1200 vrypů/mm.



Obrázek 7: Použitý Ramanův konfokální mikroskop XploRA<sup>TM</sup>.

### 3.1.2. Skenovací elektronový mikroskop (SEM)

Vybrané vzorky byly následně analyzovány také skenovacím elektronovým mikroskopem (Quanta FEG 450 s EDS analyzátozem APOLLO X a Philips XL30). Aby vzorky mohly být analyzovány touto metodou, musely být pokoveny tenkou vrstvou zlata nebo uhlíku.

Přesnější charakterizace morfologie, velikosti a zjištění elementárního složení detekovaných pevných částic byla provedená doplňující analýza skenovacím elektronovým mikroskopem FEG 450 (FEI) s EDS analyzátozem APOLLO X (EDS), (Obrázek 8a) a skenovacím elektronovým mikroskopem XL30 (Obrázek 8b)

Oba použité typy mikroskopů používají k měření dva zobrazovací detektory: SE – detektor sekundárních elektronů a BSE – detektor zpětně odražených elektronů. Přístroj má navíc rentgenový (RTG) detektor na mikroanalýzu vzorků (SEM - EDS).



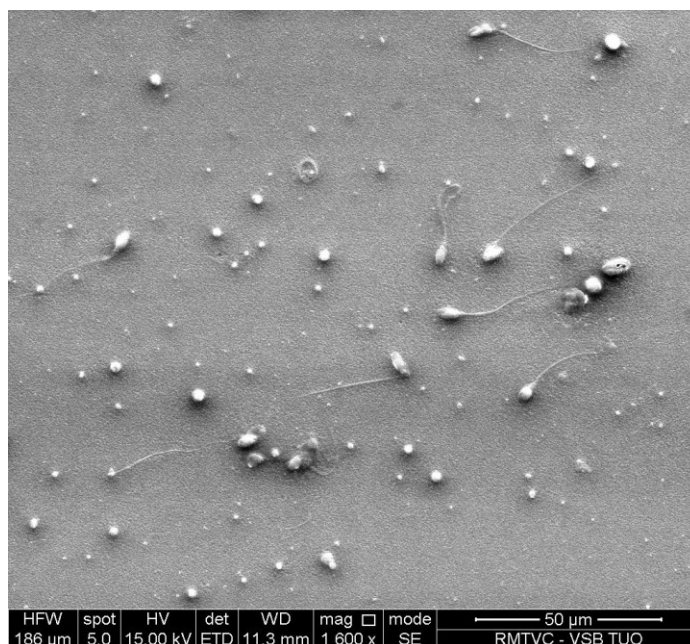
Obrázek 8: Použité skenovací elektronové mikroskopy.  
a) FEG 450 (FEI) s EDS analyzátozem APOLLO X (EDS); b) XL30.

### 3.2. Vzorky

Analyzované vzorky byly získány ve spolupráci s CGB laboratoří klinické genetiky v Ostravě – Vítkovicích. Soubor poskytnutých vzorků obsahoval celkem deset vzorků ejakulátu od různých respondentů, ve všech případech se jednalo o neplodné muže. Pacienty pocházeli vesměs z Moravskoslezského kraje.

#### 3.2.1. Příprava vzorků

Původní vzorek semene byl naředěn roztokem PBS na koncentraci max 20 milionů spermií/ml, aby vzorek nebyl příliš hustý. Naředěný vzorek byl smíchán s agarózou. Do středu kruhu na podložním sklíčku bylo kápnuto 10 – 12  $\mu$ ml směsi a poté bylo na směs přiloženo krycí sklíčko. Po ztuhnutí agarózy v chladu bylo krycí sklíčko sejmuta a poté byl do kruhu na skle kápnut denaturační roztok tak, aby byl celý vzorek roztokem zakrytý. Po slití denaturačního roztoku byl vzorek zakryt lyzačním roztokem, který byl poté ze skla opět slit. Nakonec byl vzorek dehydratován přelitím 70% alkoholu a inkubován ve 100% alkoholu. Po slití alkoholu se vzorek nechal uschnout a tím byl připraven k následné analýze. Informace o pacientech byly získány ve spolupráci s cytogenetickou laboratoří v Ostravě – Vítkovicích, CGB laboratoř a.s. Ostrava. Od všech pacientů byl prostřednictvím této laboratoře získán informovaný souhlas, dle platné legislativy.



Obrázek 9: Snímek spermií ze SEM, měřeno v režimu sekundárních elektronů.

### 3.3. Výsledky a diskuze

Všechny vzorky byly analyzovány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a Ramanova mikrospektroskopu. V Tabulce 1 jsou uvedeny dostupné informace o pacientech a zároveň informace o jednotlivých vzorcích ejakulátů. Současně jsou zde uvedeny částice a sloučeniny na bázi kovů, zjištěné ve vzorcích.

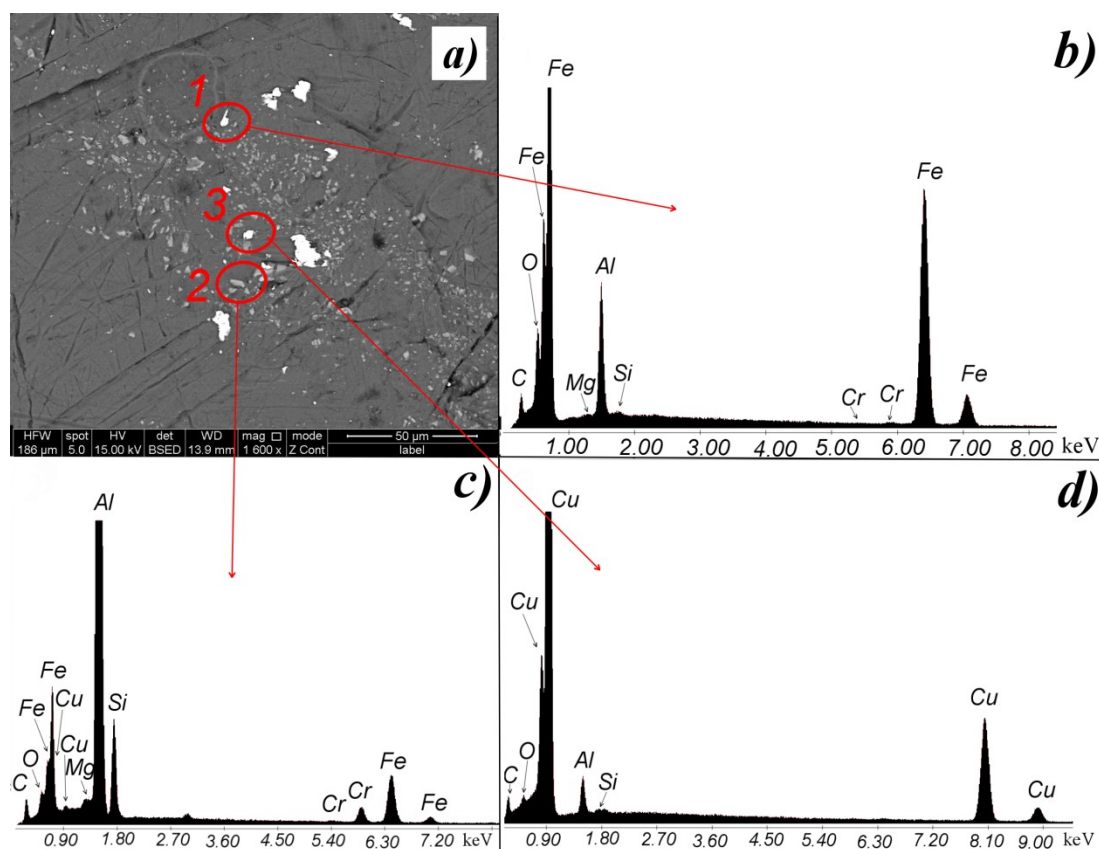
Tabulka 1: Informace o analyzovaných vzorcích a souhrn detekovaných částic a sloučenin.

vzorek	věk	diagnóza	počet spermií [mil/ml]	fragmentovaná DNA [%]	detekované prvky	detekované sloučeniny
1	30	neplodnost	8,3	24	Fe, Al, Zn	-
2	30	neplodnost	106	47	Fe, Cu, Cr, Zn	-
3	43	neplodnost	100	6	Al,	-
4	38	neplodnost	80	36	Fe, Al, Zn, Ti	-
5	36	neplodnost	75	19	Ti, Cr, Ni	-
6	42	neplodnost	-	14	Al,Cu,Ti, Fe	-
7	33	neplodnost	152	38	Al, Fe, Zn,Ti	-
8	37	neplodnost	21	82	Cu, Fe, Cr, Al,Ti	TiO <sub>2</sub> -Rutil, CaCO <sub>3</sub>
9	33	neplodnost	55	35	Fe	
10	39	neplodnost	5	18	-	

Z dat uvedených v tabulce vyplývá, že částice železa byly zjištěny u sedmi vzorků ejakulátu z celkových deseti hodnocených. Současně také hliník byl detekován u šesti vzorků z celého souboru a také titan byl nalezen u poloviny všech hodnocených vzorků. Ostatní kovy (chrom a měď) byly zjištěny u třech vzorků z celého souboru. Nejvyšší zastoupení kovů bylo zjištěno ve vzorku číslo 8, kde se také pomocí Ramanova mikrospektroskopu podařilo identifikovat sloučeninu oxidu titaničitého – rutil. Současně počet spermií ve vzorku 8 byl nízký a naopak procento fragmentace poměrně vysoké. Z informací v tabulce lze v souboru hodnocených vzorků dále vyzorovat velký rozptyl počtu spermií v mililitru ejakulátu. Jak již bylo zmíněno v teoretické části, počet spermií v ejakulátu pod 10 milionů může znamenat určitý problém s plodností. Takto nízký počet spermií mají v našem hodnoceném souboru pouze dva vzorky. Naopak, vyšší počet spermií v jednom mililitru ejakulátu (nad 100 mil.) můžeme pozorovat u tří vzorků v tomto souboru. Z této informace vyplývá, že neplodnost u mužů nelze přičítat pouze nízkému počtu spermií v ejakulátu, ale může mít souvislost mimo jiné také s fragmentací DNA (viz. Teoretická část práce). Buňky spermatu, které mají porušenou DNA, buď vůbec

neoplovní buňku vajíčka, nebo pokud již k oplodnění dojde, v mnoha případech pak dochází k selhání ve správném vývoji embrya a samovolnému potratu. Existují však případy, kdy je diagnostikovaná pacientovi neplodnost, přestože v hodnoceném vzorku ejakulátu není zjištěna vysoká procentuální fragmentace DNA a současně počet spermií neklesá pod hranici 100 mil spermií v 1 ml. V takovém případě se pravděpodobně může jednat o jinou příčinu tohoto problému. Jednou z těchto příčin by mohla být právě přítomnost částic na bázi kovů, především mikronových a submikronových rozměrů.

### 3.3.1. Částice detekované pomocí SEM - EDS



Obrázek 10: SEM snímek detekovaných částic ve vzorku číslo 8 (a) s příslušnými EDS spektry s majoritním podílem železa (1b), hliníku, železa a chromu (2c) a mědi (3d) .

Na snímku ze skenovacího elektronového mikroskopu (Obrázek 10a) jsou viditelné částice s majoritním obsahem kovů, které byly detekovány ve vzorku ejakulátu číslo 8. Tyto částice jsou ve velikosti přibližně 5  $\mu\text{m}$ . Nicméně pravděpodobně se jedná spíše o shluky menších částic. Částice 1 (Obrázek 10b) je primárně složena ze železa, dále pak z hliníku a chromu. Současně byl zjištěn kyslík, jedná se tedy pravděpodobně o kovy ve formě oxidů. Obecně kovové částice, především jejich oxidy, mohou poškodit organismus uvnitř, a to mechanickým procesem zahrnující oxidační stres a proinflamační reakce.

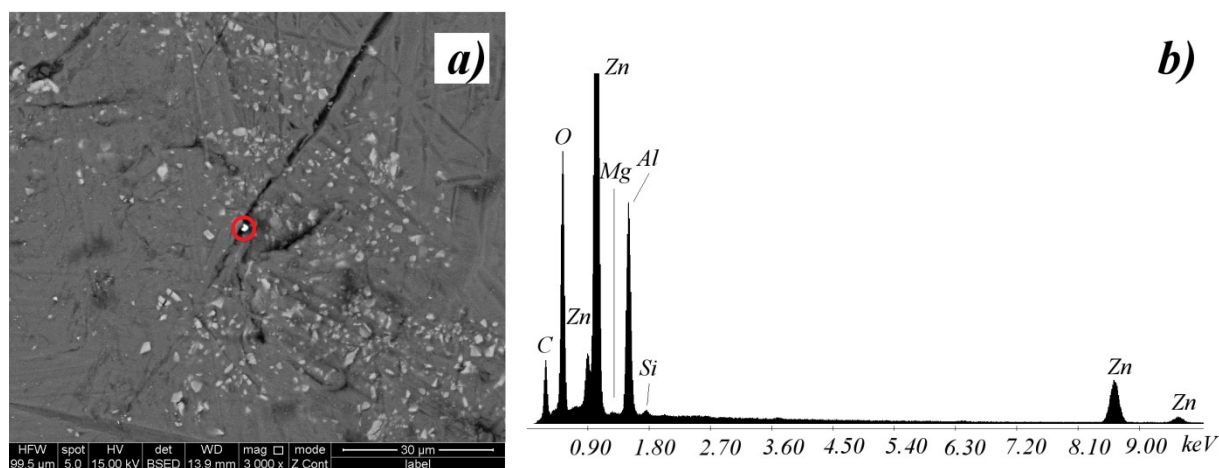
Oxidační stres je způsoben reaktivními formami kyslíku, tzv. ROS, které mohou vzniknout toxicitou kovů [64]. Tyto radikály nejčastěji ovlivňují a poškozují proteiny, DNA a tuky obsahující polynenasycené mastné kyseliny [64], ale také se podílejí na vzniku a rozvoji různých nemocí, nebo fyziologickém stárnutí organismu. ROS jsou molekuly, atomy nebo ionty s jedním nebo s více nepárovými elektrony ve valenční sféře. Mají vysokou chemickou reaktivitu a spouští řetězové reakce, při kterých jeden radikál vytváří další. Mezi ROS patří volné radikály vzniklé z molekuly kyslíku (superoxid  $O_2^{\bullet}$ , hydroxylový radikál  $HO^{\bullet}$ , peroxy  $ROO^{\bullet}$ , alkoxy  $RO^{\bullet}$ , hydroperoxy  $HO_2^{\bullet}$ ) obsahující nepárový elektron. Také zde patří sloučeniny kyslíku, ze kterých radikály mohou vznikat (peroxid vodíku  $H_2O_2$ , ozon  $O_3$ , kyselina chlorná  $HClO$ ). Reaktivní formy kyslíku mohou vznikat např. oxidací, při které dochází ke ztrátě elektronu, redukcí, při které se elektron získá nebo homolytickým štěpením kovalentní vazby, při kterém je nutno dodat velké množství energie. V organismu ROS vznikají dvěma způsoby, a to při neenzymových a enzymových reakcích. Volné kyslíkové radikály iniciují mnohé biochemické reakce a ovlivňují jejich rychlost a směr. V těle mají volné radikály také škodlivý účinek, mohou totiž působit proti vlastním tkáním tím, že poškodí různé struktury na subcelulární i celulární úrovni, důsledkem jsou poruchy v organismu [65]. Tuto skutečnost mohou částečně potvrdit studie, ve kterých již bylo zjištěno, že existuje určitá souvislost mezi přítomností částic s obsahem železa v lidském organismu a některými nemocemi. Příkladem může být detekce submikronových částic na bázi železa v plicních nádorech [56], nebo také detekce  $Fe_3O_4$  v mozkové tkáni postižené neurodegenerativními změnami [57,58]. Wise a kol (2003) provedl studii, která se zaměřila na vliv nadbytku železa na sperma kanců. Bylo zjištěno, že kanci s nadměrnou hladinou železa produkovali méně spermatu [94]. Sullivan (1981) se ve své studii zaměřil na souvislost infarktu myokardu s pohlavím a věkem pacientů. Zájem vyvolala především statistická data, která ukazují infarkt myokardu ve zvýšeném počtu u mužů bez věkového omezení a u žen ve věku po menopauze. Ve studii se došlo k závěru, že selhání myokardu souvisí s ukládáním železa, které je u žen v mladém věku vyšší, než je tomu právě v jejich pozdějším věku a u mužů celkově [90]. Existují také studie (Loh a kol., 2009), které spojují přebytek železa v těle s očními nemocemi [91]. Oxidační stres způsobený železem a akumulace železa v játrech hraje také roli při jatrním onemocnění alkoholických pacientů, což bylo zjištěno ve studii Peteresena a kol. (2005) [92]. Přetížení železem způsobuje kardiovaskulární toxicitu a ta je nejčastější příčinou úmrtí pacientů s krevní chorobou [93]. Marzec-Wróblewsky a kol. (2011) provedli studii zaměřenou na vliv nadbytku železa na lidské sperma. Výsledky poukazují na to, že železo může ovlivňovat morfologii spermií [95].



Dále byly ve vzorku číslo 8 zjištěny částice s vyšším obsahem hliníku. S hliníkem a jeho sloučeninami se člověk setkává běžně, tvoří cca 8 % zemského povrchu a objevuje se v automobilovém průmyslu, léčivech, kosmetice, výrobcích do domácnosti atd. [96]. Podle Molda a kol. (2018) vysoká hladina hliníku v lidském mozku souvisí s autismem [97]. Hliník je silný neurotoxikant a existují důkazy o tom, že hraje důležitou roli v patogenezi Alzheimerovy nemoci [98]. Klein a kol. (2014) provedli studii, ve které se zaměřili na obsah hliníku v lidském spermatu. Bylo zjištěno, že koncentrace hliníku je ve spermatu v porovnání s jinými biologickými tekutinami značně vyšší. Nebyly nalezeny žádné přímé důkazy o tom, že hliník ovlivnil funkci spermatozoid, hliník je však známým mutagenem, takže není vyloučen jeho vliv na životaschopnost spermií. Vysoká koncentrace hliníku byla vypořádována u mužů, kteří měli problém s plodností [99].

Reaktivní formy kyslíku mohou být tvořeny nejen výše uvedeným železem, ale také ostatními kovy, jako jsou například měď a chrom [64]. Částice s obsahem mědi byla také detekována ve vzorku mužského ejakulátu číslo 8 (Obrázek 10d). Měď se může do lidského těla dostat inhalací, s potravou, nebo pitím vody. Do ovzduší se měď může uvolnit při její těžbě nebo těžbě jiných kovů. Dalšími možnostmi, jakými se do životního prostředí měď může dostat, jsou např. skládky, spalování fosilních paliv, výroba fosfátových hnojiv nebo z přírodních zdrojů (prach z větru, sopky, lesní požáry atd.). Některé ve vodě rozpustné sloučeniny mědi pronikají do podzemních vod. Elementární měď se v životním prostředí nerozkládá. Nachází se v rostlinách, ve zvířatech a ve vysokých koncentracích v mořských živočiších, jakou jsou slávky a ústřice [66]. Měď je nezbytná pro lidské zdraví, expozice vyšších koncentrací však může být škodlivá. Po požití většího množství mědi může způsobit nevolnost, zvracení, žaludeční křeče nebo průjem [67]. Záměrně vysoký příjem mědi může poškodit játra a ledviny [66]. Pracovníci vystavení měděnému prachu hlásí řadu příznaků, které naznačují podráždění dýchacích cest, včetně kašle a kýchání. Stuciu a kol. (1981) provedli studii na 75 - 100 pracovnících podílejících se na broušení a prosévání mědi, kteří byli vystaveni mědi v koncentraci 434 mg/m<sup>3</sup> po dobu jednoho roku. Rentgenologické vyšetření plic odhalila lineární pulmonární fibrózu. Krom respiračních onemocnění byly také zkoumány reprodukční účinky mědi u těchto pracovníků. Sexuální impotence byla zjištěna u 16 % pracovníků. Dřívější studie (Armstrong a kol., 1983, Gleason 1968) zaznamenaly také horečku kovových dýmů, což je krátká nemoc trvající 24 – 48 hodin. Tato nemoc je charakterizována zimnicí, horečkou, bolestmi svalů, suchostí v ústech a krku a bolest hlavy [68].

Současně byla ve vzorku číslo 8 zjištěna přítomnost chromu (Obrázek 10b, 10c). Chrom je široce používaný prvek v lékařských a zubních implantátech, zařízeních a nástrojích. Dostatek chromu vytváří na slitinách ochranu proti korozi. Nízké koncentrace chromu se využívají k léčebným účelům a chrom se také podílí na přirozeném metabolismu tuků a bílkovin při těchto procesech se uplatňuje trojmocný chrom. Druhá stabilní forma chromu je šestimocný chrom, ten je při vysokých koncentracích toxický a karcinogenní. Chrom se do lidského těla může dostat znečištěnou vodou, nebo z korodujících přístrojů při stomatologických vyšetřeních, toto exponované množství je však velmi nízké až zanedbatelné [69]. Reprodukční účinky chromu byly pozorovány ve studii, kterou provedl Kumar a kol. (2005) v Indii. Kvalita spermií byla vyhodnocena u 61 pracovníků v zařízení na výrobu síranu chromitého, byla zde také kontrolní skupina 15 neexponovaných pracovníků. Nebyl zjištěn žádný vliv chromu na objem spermatu, pH nebo na počet, motilitu a životaschopnost spermií. Byl však vypořován výrazný nárůst morfologicky abnormálních spermií u exponovaných pracovníků. V exponované skupině mělo 53 % pracovníků méně než 30 % normálních spermií, oproti tomu, v kontrolní skupině mělo pouze 10 % pracovníků méně než 30 % normálních spermií [70]. Vysokou fragmentaci DNA, která je u vzorku číslo 8 uvedena v tabulce (Tabulka 1) je možno tedy přisoudit právě přítomnosti chromu v ejakulátu.

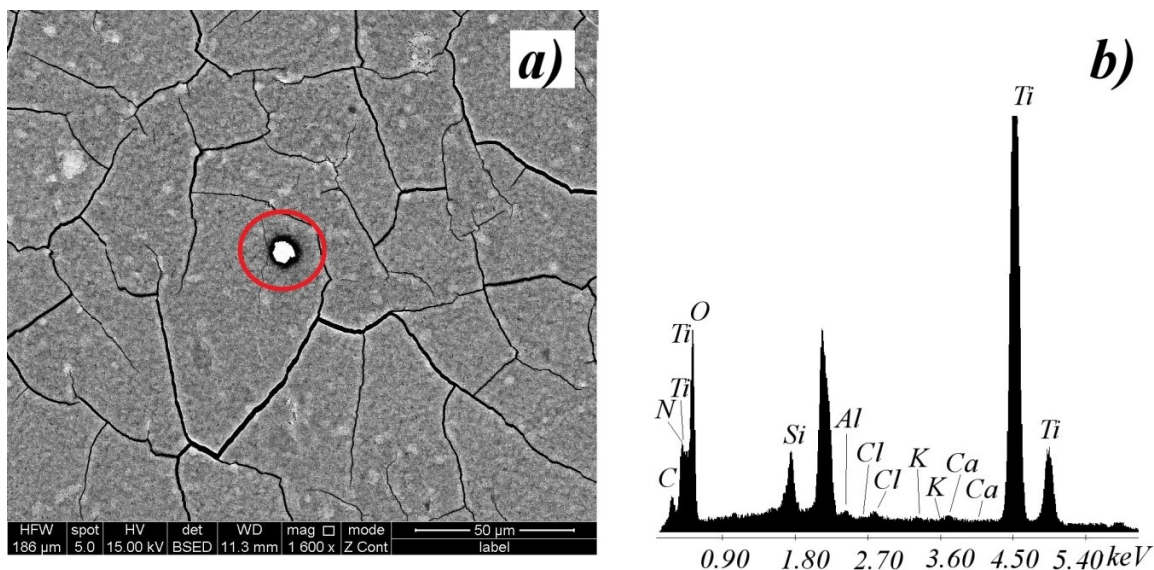


Obrázek 11: SEM snímek detekované částice s majoritním podílem zinku (a) a příslušné EDS spektrum (b).

Další zjištěnou částici s majoritním obsahem kovu ve vzorku ejakulátu číslo 8 je zinek. Částice na snímku je ve velikosti okolo 1,3  $\mu\text{m}$ . Při detailnějším zkoumání lze pozorovat,



že se pravděpodobně opět jedná spíše o shluk mnohem menších částic. Zinek je biogenní prvek a může se v mužském ejakulátu objevovat zcela přirozeně, hraje důležitou roli jako esenciální stopový prvek pro vývoj, růst a diferenciaci všech živých organismů [60]. V přírodě se zinek vyskytuje pouze ve sloučeninách. Do životního prostředí se však také může dostávat jako výsledek důlní činnosti, v důsledku výroby oceli, spalování uhlí a odpadů [61]. Zinek se ovšem také přidává do brzdových desek a pneumatik automobilů. Vlivem brzdících procesů, při kterých dochází k otírání jednotlivých komponent, se pak může uvolňovat do prostředí [62,63]. Uvádí se, že zinek je čtvrtým průmyslově nejvíce vyráběným kovem [59]. Dále se zinek používá také při výrobě slitin, je součástí např. mosazi. Elementární zinek nachází výrazné uplatnění jako antikorozi ochrana jiných kovů především železa a jeho slitin [59]. Nedostatek zinku může způsobovat špatné hojení ran, zhoršení paměti, oči choroby či neplodnost. Na druhou stranu, ve vysokých koncentracích je pro lidský organismus škodlivý a poškozuje gastrointestinální trakt. Chronický nadbytek zinku způsobuje poruchy trávení a metabolismu cukru, nebo chudokrevnost [60]. Častější problém pro lidský organismus tedy představuje nedostatek zinku. To je také důvod, proč se většina studií zaměřuje převážně na spojitost mezi nedostatkem zinku a neplodností mužů. Studie, kterou provedl Zhao a kol. (2016) shrnovala poznatky mnoha předchozích studií, které se zaměřovaly na neplodnost mužů v souvislosti s obsahem zinku v mužském ejakulátu. V této studii byla provedena metaanalýza. Byly pozorované vzorky ejakulátu neplodných i plodných mužů. Bylo vypořádáno, že koncentrace zinku v ejakulátu neplodných mužů je výrazně nižší než u plodných mužů. Po doplnění zinku do vzorků ejakulátů neplodných mužů došlo ke zlepšení motility spermií, zvětšil se jejich objem a také procento normálně monologovaných spermií. Studie tedy ukázala, že doplněním zinku se může zvýšit reprodukční schopnost mužů. Toto zjištění by mohlo vést k novým možnostem výzkumu a léčby neplodnosti [71]. Další studie (Wu a kol, 2015) byla zaměřená přímo na schopnost zinku ovlivnit cíleně poškozené spermie. Vzorky spermatu 20 zdravých mužů byly vystaveny roztoku peroxidu vodíku a roztoku peroxidu vodíku as chloridem zinečnatým. U vzorků, které byly vystaveny působení peroxidu vodíku, došlo u spermií k výraznému poklesu motility a životaschopnosti, ale výrazně se zvýšila fragmentace DNA. U vzorků, které byly vystaveny roztoku peroxidu vodíku a chloridu zinečnatého, naopak došlo ke zlepšení hodnot. Závěrem této studie je tedy pozorování, že přidaný zinek chrání spermie před reaktivními formami kyslíku (ROS), které vznikají např. z peroxidu vodíku. Pokud je však zinek přidán samostatně, může po 24 hodinách dojít ke snížení kvality spermií [72].



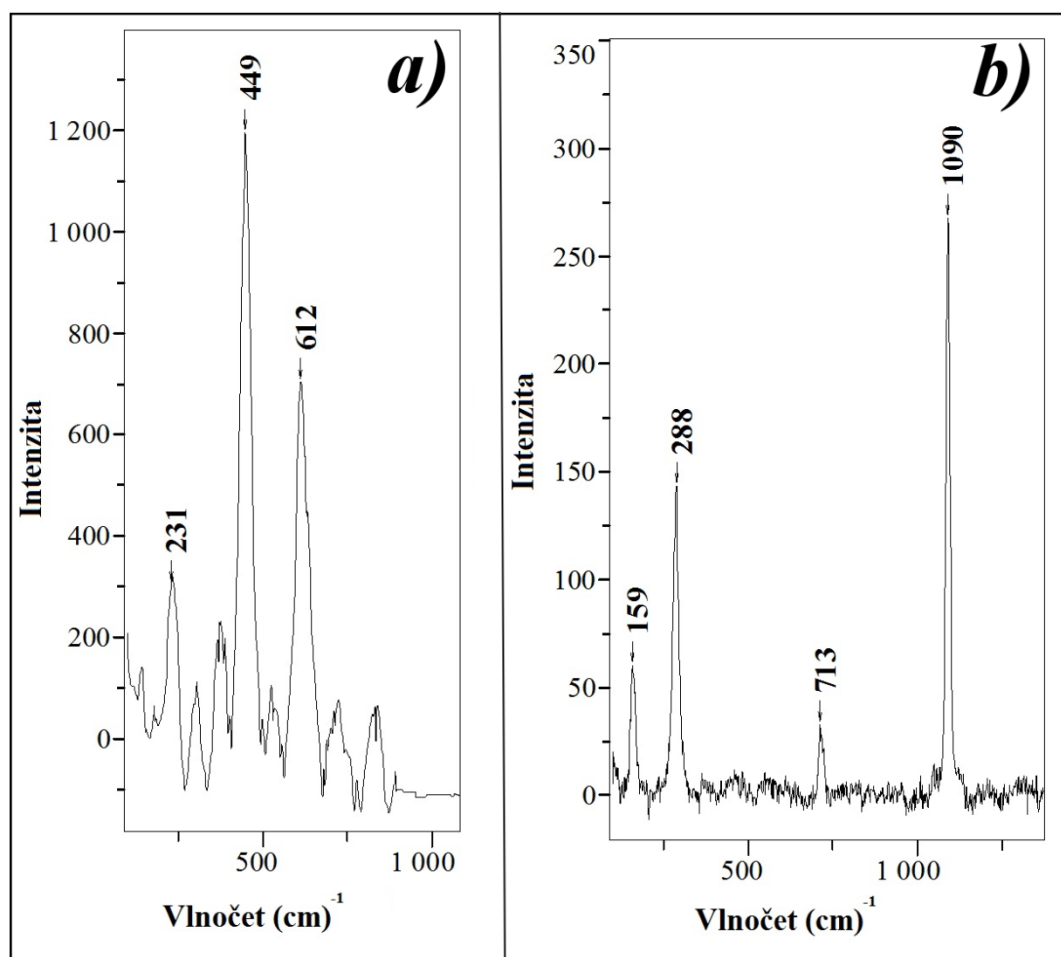
Obrázek 12: SEM snímek detekované částice s majoritním podílem titanu (a) a příslušné EDS spektrum (b).

Také ve vzorku ejakulátu číslo 4 byly zjištěny částice na bázi kovů. Příkladem je částice s majoritním obsahem titanu (Obrázek 14). Tato částice je ve velikosti okolo 8 μm. Titan je biokompatibilní prvek, to souvisí s jeho použitím v medicíně. Titan a jeho slitiny se používají k výrobě různých kloubních náhrad, např. kyčelních a kolenních kloubů [73]. Dalším odvětvím medicíny, kde titan nachází uplatnění je stomatologie. Čím dál častěji se uplatňuje jako materiál pro pevné zubní náhrady [74]. Díky svým dobrým vlastnostem je titan výborným materiálem pro průmysl. Vysoká pevnost v porovnání s jeho hmotností a odolnost vůči korozi jej předurčuje k aplikacím v leteckém průmyslu. Problém je ale vysoká pořizovací cena [75]. Titanové slitiny slouží v leteckém průmyslu např. k výrobě rotorů helikoptér, součástek leteckých motorů či součástek v raketovém a kosmickém oboru [76]. Vysoká pevnost, nízká hmotnost a odolnost proti korozi umožňuje titan a jeho slitiny používat také v automobilovém průmyslu [77], konkrétně se z titanových slitin vyrábí ventily, trysky, spojovací tyče atd. [76]. Titanové slitiny jsou také běžně používány při výrobě módních doplňků, jako jsou brýle, šperky nebo hodinky, dále pak při výrobě sportovního vybavení, jakou lyže, tenisové rakety nebo rámy jízdních kol [76]. Zdrojů titanu je tedy v běžném životě kolem nás mnoho a pravděpodobnost, že mohou proniknout do lidského organismu je relativně vysoká. Příkladem lze uvést studii Friskena a kol. (2002), který zkoumal uvolňování titanu ze šroubových implantátů do tělesných orgánů. Testovanými subjekty zde byly ovce, kterým byl implementován jeden samořezný

implantát o rozměrech 10x2,37 mm po časové intervaly jeden, čtyři, osm a dvanáct týdnů. Kontrolní vzorek představovaly neoperované ovce. Po usmrcení ovci byly zkoumány lymfatické uzliny, játra, plíce a slezina. Výsledky nevykazovaly statisticky významné odlišné úrovně titanu v žádném z orgánů v porovnání s kontrolními vzorky. Bylo však zaznamenáno určité malé zvýšení hladin titanu v plicích a mizních uzlinách. Výsledkem této studie bylo, že úlomky z jednoho vloženého implantátu jsou na tak nízké úrovni, že je nepravděpodobné, aby představovaly zdravotní riziko [85].

### 3.3.2. Částice detekované pomocí Ramanovy mikrospektroskopie

Pro získání informací o fázovém složení bylo všech deset vzorků analyzováno pomocí Ramanovy mikrospektroskopie. Nicméně pouze ve vzorku 8 se podařilo zjistit sloučeninu oxidu titaničitého - rutil (Obrázek 16a) a sloučenina uhličitany vápenatého (Obrázek 16b).



Obrázek 13: Ramanovo spektrum oxidu titanu ve formě rutilu (a) uhličitany vápenatého (b).

Oxid titaničitý se vyskytuje ve třech různých modifikacích (anatas, rutil a brookit). Detekovaný oxid titaničitý byl ve formě rutilu, který je známý také pod názvem titanová běloba a je nejčastější modifikací oxidu titaničitého. Rutil nachází využití v různých odvětvích průmyslu. Využití nachází při polovodičových fotokatalýzách pro environmentální a energetické aplikace [78]. Pro své fotokatalytické účinky je oxid titaničitý hojně využíván v různých aplikacích a výrobcích v oblasti životního prostředí a energetiky. Konkrétně jsou to např. samočistící povrchy, systémy čištění vzduchu a vody či sterilizace [79]. Velký význam má oxid titaničitý v kosmetice. Spolu s oxidem zinečnatým je hlavní složkou krémů na opalování [80], nachází se také v dekorativní kosmetice [81]. Oxid titaničitý je také častou přísadou zubních past [82]. Nalézt jej můžeme také v potravinách [83]. Největší rizika pro lidský organismus představuje přítomnost oxidu titaničitého právě v kosmetice a v potravinách, z těchto zdroj se částice mohou do těla dostat nejsnadněji.

Působení oxidu titaničitého na lidský organismus bylo již předmětem mnoha studií. Jedna ze studií (Baggs a kol, 1997) pozorovala poranění plic potkanů v souvislostech s inhalovanými částicemi oxidu titaničitého různých velikostí. Zkoumání byli samci potkanů, ti byli vystaveni 6 hodin denně, 5 dní v týdnu po dobu 3 měsíců částicím oxidu titaničitého o koncentracích 22,3 mg/m<sup>3</sup> a 23,5 mg/m<sup>3</sup>. Výsledkem bylo zjištění, že inhalace ultrajemných částic o velikosti 20 nm vede k větší plicní zánětové reakci než větší částice velikosti 250 nm [84]. Další studie (Liu, 2009) se zaměřila na to, jak a kam se exponované částice oxidu titaničitého ukládají. Zkoumaným myším byl práškový oxid titaničitý velikosti 5 nm injektován do břišní dutiny každý den po dobu 14 dnů. Po usmrcení byly analyzovány orgány jednotlivých myší a ukázalo se, že s rostoucími dávkami oxidu titaničitého se koeficienty jater ledvin a sleziny postupně zvyšovaly, zatímco koeficienty plic a mozku se postupně snižovaly. Koeficient srdce se skoro nezměnil. Akumulace titanu v orgánech byla vypořizována následovně: játra>ledviny>slezina>plíce>mozek>srdce. Vysoké dávky oxidu titaničitého způsobilo vážné poškození jater a ledvin myší, došlo také k narušení rovnováhy hladiny cukru v krvi a lipidů [86]. Noqueira a kol. (2012) se ve své studii zaměřili na možné gastrointestinální onemocnění spojené s expozicí oxidu titaničitého, Konkrétně byl zkoumán vliv nano- a mikročástic oxidu titaničitého na tenké střevo myší. Samci myší dostávali suspenze destilované vody obsahující oxid titaničitý (100 mg/kg tělesné hmotnosti) jako nanočástice TiO<sub>2</sub> (66 nm) nebo mikročástice TiO<sub>2</sub> (260 nm) po dobu 10 dnů jednou denně. Kontrolní skupina měla pouze destilovanou vodu. Výsledek ukazuje na to, že existuje souvislost mezi

perorální expozici oxidu titaničitého a vznikem zánětu tenkého střeva. Byly také porovnány účinky nano- a mikročástic  $\text{TiO}_2$ , bylo prokázáno, že nanočástice jsou toxičtější než částice stejného složení, ale větší velikosti [87]. Účinky nanočástic oxidu titaničitého na reprodukční systém myších samců zkoumal Guo a kol. (2009). Celkem 45 samců ve věku 6 týdnů bylo náhodně rovnoměrně rozděleno do dvou experimentálních skupin a jedné kontrolní. První experimentální skupina byla injektována nanočásticemi  $\text{TiO}_2$  o koncentraci 200 mg/kg tělesné hmotnosti a druhá skupina byla injektována nanočásticemi  $\text{TiO}_2$  o koncentraci 500 mg/kg tělesné hmotnosti. Obě experimentální skupiny byly injektovány každý druhý den, celkem pětkrát a usmrceny byly týden po poslední expozici. Při analýze mikroskopem byl pozorován počet, motilita a abnormalita spermií. Výsledky ukázaly, že skupina s nízkou dávnou (200 mg/kg) neprokázala žádné významné změny v pozorovaných parametrech. Skupina s vysokou dávnou (500 mg/kg) již změny v parametrech vykazovala. U této skupin došlo k výraznému snížení hustoty a pohyblivosti spermií, ale došlo také ke zvýšení abnormalit. Studie tedy prokázala, že nízká dávka nanočástic  $\text{TiO}_2$  nemá zřetelný vliv na sperma myši, ale vysoká dávka může výrazně snížit počet a funkci spermií [88]. Je tedy pravděpodobné, že částice oxidu titaničitého mohou mít vliv na reprodukční systém.

V této práci byl titan detekován u poloviny hodnocených vzorků s diagnostikovanou neplodností. Dalo by se tedy usuzovat na určitou souvislost mezi přítomností titanu v ejakulátu a mužskou neplodností. Větší zájem studií, v souvislostech s lidským organismem, zaujímá anatas, nebo se porovnávají účinky anatasu a rutilu. Například Yu a kol. (2017) porovnával toxicitu anatasu a rutilu pro makrofágy. Ukázalo se, že nanočástice rutilu mají vyšší toxicitu a k makrofágům než nanočástice anatasu [99]. Bettini a kol (2017) svou studii zaměřil na rutil, který se v potravinářství označuje jako E171 a jeho vliv na střeva hlodavců a člověka. Výsledkem této studie bylo zjištění, že krátkodobá expozice E171 nemá na střeva výrazný vliv. Po dlouhodobé expozici však došlo u 40 % zkoumaných potkanů k nárůstům preneoplastických lézí v tlustém střevě, což naznačuje, že E171 může spouštět preneoplastické stavy karcinogeneze v tlustém střevě. Rutil označený E171 je v dnešní době klasifikován jako potenciální karcinogen pro člověka [100].

Detekovaná částice uhličitanu vápenatého je běžnou součástí biologických vzorků. Ostatní sloučeniny touto metodou nebyly zjištěny. Pravděpodobně jejich množství v ejakulátu bylo pod detekční hladinou metody. Přesto je tato metoda vhodná, jako

doplňkovou metodu pro SEM-EDS, z důvodu upřesnění fázového složení jednotlivých detekovaných elementů. Na základě výše uvedených informací lze říci, že může existovat jistá závislost mezi výskytem pevných částic na bázi kovů v mužském ejakulátu a neplodností. Pro potvrzení tohoto zjištění by bylo vhodné rozšířit soubor o větší počet respondentů. V této práci se jednalo o pilotní studii problematiky detekce mikronových a submikronových částic v mužském ejakulátu, z toho důvodu byly analyzovány pouze vzorky získané od mužů s diagnostikovanou neplodností. Do budoucna by bylo vhodné analyzovat také soubor vzorů ejakulátu získaných od mužů bez této diagnózy.

#### 4. Závěr

V této bakalářské práci byla provedena literární rešerše, která poskytla informace o tom, jak mohou být nanomateriály exponovány člověkem a jaký vliv mohou na lidský organismus mít.

V praktické části byl analyzován soubor deseti vzorků mužského ejakulátu, který byl získán ve spolupráci s CGB laboratoří klinické genetiky v Ostravě – Vítkovicích. Detekce částic byla provedena prostřednictvím skenovacího elektronového mikroskopu a Ramanova mikrospektroskopu..

Ve vzorcích ejakulátu bylo zjištěno poměrně velké množství částic na bázi kovů různého chemického složení (Fe, Al, Cu, Cr, Zn, Ti). Některé z těchto chemických látek mohou působit na celou řadu biologických procesů v organismu. Mnohé studie prokázaly již přímou souvislost mezi těmito kovovými částicemi (převážně částice oxidů železa a částice oxidu titanu, ale také mnohé další) a některými nemocemi u zvířat, ale i u člověka. Na základě tohoto zjištění, lze tedy předpokládat, že částice s obsahem kovů (Fe, Al, Cu, Cr, Zn, Ti) mohou mít jistý vliv na snížení mužské reprodukce. Mechanismus působení není zcela objasněn, ale z důvodu vysoké reaktivity a následné toxicity těchto částic, ať už složením, či velikostí může docházet k poškození DNA a následného snižování počtu a kvality spermií.

Vzhledem k tomu, že v této práci prozatím nebyly analyzovány referenční vzorky mužského ejakulátu k porovnání, bude možná souvislost detekovaných částic s mužskou neplodností dále zkoumána. Po analýze většího souboru vzorků společně se vzorky referenčními bude možno diskutovat, jaké částice se v mužském ejakulátu nacházejí běžně a které můžou mít přímou souvislost s poruchou plodnosti.

## 5. Použitá literatura

- [1] ČECH BARABASZOVÁ, Karla. Nanotechnologie a nanomateriály. Ostrava: Tiskárna Schenk, 2006. ISBN 80-248-1210-X.
- [2] Definition of a nanomaterial. In: European Commission: Environment [online]. Brussels [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm)
- [3] V.V. Pokropivny, V.V. Skorokhod, Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science, In Materials Science and Engineering: C, Volume 27, Issues 5–8, 2007, Pages 990-993, ISSN 0928-4931.
- [4] Jitendra N. Tiwari, Rajanish N. Tiwari, Kwang S. Kim, Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices, In Progress in Materials Science, Volume 57, Issue 4, 2012, Pages 724-803, ISSN 0079-6425
- [5] Fundamentals of nanomaterials. In: Tallinn University of Technology [online]. Tallinn [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: [https://www.ttu.ee/public/m/Mehaanikateaduskond/Instituudid/Materjalitehnika\\_instituut/MTX9100/Lecture5\\_NanomatFundamentals.pdf](https://www.ttu.ee/public/m/Mehaanikateaduskond/Instituudid/Materjalitehnika_instituut/MTX9100/Lecture5_NanomatFundamentals.pdf)
- [6] FILLIPONI, Luisa a Duncan SUTHERLAND. Nanoscience in Nature. In: NANO YOU [online]. Denemark, ©2016, 2010 [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: [http://nanoyou.eu/attachments/188\\_Module-1-chapter-2-proofread.pdf](http://nanoyou.eu/attachments/188_Module-1-chapter-2-proofread.pdf)
- [7] VALÁŠKOVÁ, Marta. Vybrané vrstevnaté silikáty a jejich modifikované nanomateriály. 2., dopl. a opr. vyd. Brno: Akademické nakladatelství CERM, 2014. ISBN 978-80-7204-886-1.
- [8] Prashant Kumar, Lidia Morawska, Wolfram Birmili, Pauli Paasonen, Min Hu, Markku Kulmala, Roy M. Harrison, Leslie Norford, Rex Britter, Ultrafine particles in cities, In Environment International, Volume 66, 2014, Pages 1-10, ISSN 0160-4120
- [9] Carmela Protano, Maurizio Manigrasso, Pasquale Avino, Matteo Vitali, Second-hand smoke generated by combustion and electronic smoking devices used in real scenarios: Ultrafine particle pollution and age-related dose assessment, In Environment International, Volume 107, 2017, Pages 190-195, ISSN 0160-4120



- [10] Magdalena Stanislawska, Tadeusz Halatek, Malgorzata Cieslak, Irena Kaminska, Renata Kuras, Beata Janasik, Wojciech Wasowicz, Coarse, fine and ultrafine particles arising during welding - Analysis of occupational exposure, In Microchemical Journal, Volume 135, 2017, Pages 1-9, ISSN 0026-265X.
- [11] Dennekamp M, Howarth S, Dick CAJ, et al Ultrafine particles and nitrogen oxides generated by gas and electric cooking. Occupational and Environmental Medicine 2001;58:511-516.
- [12] Techniques for synthesis of nanomaterials (I). In: Tallinn University of Technology [online]. Tallinn [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: [https://www.ttu.ee/public/m/Mehaanikateaduskond/Instituudid/Materjalitehnika\\_instituut/MTX9100/Lecture11\\_Synthesis.pdf](https://www.ttu.ee/public/m/Mehaanikateaduskond/Instituudid/Materjalitehnika_instituut/MTX9100/Lecture11_Synthesis.pdf)
- [13] Synthesis of nanomaterials. In: Slide Share [online]. ©2018, 2017 [cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <https://www.slideshare.net/Krishanyadav28/synthesis-of-nanomaterials>
- [14] SIMKÓ, Myrtill, Michael NENTWITCH, André GAZSÓ a Ulrich FIEDELER. How Nanoparticles Enter the Human Body and Their Effects There. The NanoTrust Dossiers. Vienna: Institute of Technology Assessment (ITA), 2010, (3), 1-4. ISSN 1998-7293.
- [15] NanoINFO. DaNa: Informationen zu Nanomaterialien und Nano-Sicherheitsforschung [online]. Frankfurt a.M. [cit. 2017-12-08]. Dostupné z: <https://www.nanopartikel.info/en/nanoinfo>
- [16] WEIR, Alex, Paul WESTERHOFF, Lars FABRICIUS, Kiril HRISTOVSKI a Natalie VON GOETZ. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. Environmental Science & Technology. 2012, 46(4), 2242-2250. DOI: 10.1021/es204168d. ISSN 0013-936x.
- [17] YANG, Fuchao a Zhiguang GUO. Characterization of Micro-Morphology and Wettability of Lotus Leaf, Waterlily Leaf and Biomimetic ZnO Surface. Journal of Bionic Engineering. 2015, 12(1), 88-97. DOI: 10.1016/S1672-6529(14)60103-7. ISSN 16726529.
- [18] PATOČKA, Jiří. Obecná toxikologie: doplňkové texty pro posluchače kombinované formy studia studijního programu „Ochrana obyvatelstva“ [online]. České Budějovice, 2007.
- [19] RUPOVÁ, Marcela a Petr SKŘEHOT. Bezpečnost a ochrana zdraví při práci s nanomateriály příručka pro zaměstnavatele. 1.vyd. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, v. v. i., 2011. ISBN 978-80-86973-86-9.

- [20] FILIPOVÁ, Zuzana, Jana KUKUTSCHOVÁ a Miroslav MAŠLÁŇ. Rizika nanomateriálů. 1.vyd. V Olomouci: Univerzita Palackého, 2012. ISBN 978-80-244-3201
- [21] OBERDÖRSTER, Günter, Andrew MAYNARD, Ken DONALDSON et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Particle and Fibre Toxicology. 2005, 2(1), 8-. DOI: 10.1186/1743-8977-2-8. ISSN 17438977.
- [22] KOLÁŘOVÁ, Lucie. Úvod do nanovědy a nanotechnologií. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-802-4441-79
- [23] PEIKERTOVÁ, P., J. KUKUTSCHOVÁ, I. VÁVRA, V. MATĚJKA, O. ŽIVOTSKÝ, M. VACULÍK, P.W. LEE a P. FILIP. Water suspended nanosized particles released from nonairborne brake wear debris. Wear. 2013, 306(1-2), 89-96. DOI: 10.1016/j.wear.2013.07.008. ISSN 00431648.
- [24] KITTELSON, David. Engines and nanoparticles. Journal of Aerosol Science. 1998, 29(5-6), 575-588. DOI: 10.1016/S0021-8502(97)10037-4. ISSN 00218502.
- [25] KUKUTSCHOVÁ, Jana, Pavel MORAVEC, Vladimír TOMÁŠEK et al. On airborne nano/microsized wear particles released from low-metallic automotive brakes. Environmental Pollution. 2011, 159(4), 998-006. DOI:10.1016/j.envpol.2010.11.036. ISSN 02697491.
- [26] PATOČKA, Jiří. Vojenská toxikologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
- [27] TURNEJ, Jon. In: European Commission: Scientific Committees [online]. Brussels [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: [https://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/opinions\\_layman/nanomaterials/en/1-2/index.htm#0](https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/nanomaterials/en/1-2/index.htm#0)
- [28] SKŘEHOT, Petr a Marcela RUPOVÁ. Nanobezpečnost. Praha: Výzkumný ústav bezpečnosti práce, 2011. ISBN 978-80-86973-89-0.
- [29] OBERDÖRSTER, Günter, Eva OBERDÖRSTER a Jan OBERDÖRSTER. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives [online]. 2005, 113(7), 823-839. DOI: 10.1289/ehp.7339. ISSN 0091-6765.

- [30] Tsao N, Kanakamma PP, Luh T-Y, Chou C-K, Lei H-Y. Inhibition of Escherichia coli-Induced Meningitis by Carboxyfullerence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999;43(9):2273-2277.
- [31] Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev*. 2013;59:145–150.
- [32] Brohi RD, Wang L, Talpur HS, et al. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:606. doi:10.3389/fphar.2017.00606.
- [33] Hou C-C, Zhu J-Q. Nanoparticles and female reproductive system: how do nanoparticles affect oogenesis and embryonic development. *Oncotarget*. 2017;8(65):109799-109817. doi:10.18632/oncotarget.19087.
- [34] Stelzer R, Hutz RJ. Gold nanoparticles enter rat ovarian granulosa cells and subcellular organelles, and alter in-vitro estrogen accumulation. *J Reprod Dev*. 2009;55:685–690.
- [35] Blum JL, Xiong JQ, Hoffman C, Zelikoff JT. Cadmium Associated With Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles Impacts Fetal and Neonatal Development and Growth. *Toxicological Sciences*. 2012;126(2):478-486. doi:10.1093/toxsci/kfs008.
- [36] YOSHIDA, S., K. HIYOSHI, T. ICHINOSE, H. TAKANO, S. OSHIO, I. SUGAWARA, K. TAKEDA a T. SHIBAMOTO. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice. *International Journal of Andrology* [online]. 2009, 32(4), 337-342. DOI: 10.1111/j.1365-2605.2007.00865.x. ISSN 01056263.
- [37] KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- [38] DORKO, František, Eva VÝBORNÁ a Ján TOKARČÍK. *Základy anatomie pro nelékařské obory: studijní opora*. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2014. ISBN 978-80-7464-595-2.
- [39] ČIHÁK, Radomír a Miloš GRIM. *Anatomie*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2002. ISBN 80-247-0143-x.
- [40] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.

- [41] OWEN, D. H. A Review of the Physical and Chemical Properties of Human Semen and the Formulation of a Semen Simulant. *Journal of Andrology* [online]. 2005, 26(4), 459-469. DOI: 10.2164/jandrol.04104. ISSN 0196-3635.
- [42] Male Infertility. In: The American Pregnancy Association [online]. Irving, ©2018, 2017 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://americanpregnancy.org/infertility/male-infertility/>
- [43] Muži a neplodnost. In: Česká průmyslová zdravotní pojišťovna [online]. Ostrava-Vítkovice [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://www.cpzp.cz/clanek/1445-0-Muzi-a-neplodnost.html>
- [44] Male infertility. In: Andrology Australia: What every man needs to know [online]. Melbourne, 2016 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://andrologyaustralia.org/your-health/male-infertility/>
- [45] GROMADZKA-OSTROWSKA, Joanna, Katarzyna DZIENDZIKOWSKA, Anna LANKOFF, et al. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters*. 2012, 214(3), 251-258. DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.08.028. ISSN 03784274.
- [46] WANG, Enyin, Yan HUANG, Qingyun DU a Yingpu SUN. Silver nanoparticle induced toxicity to human sperm by increasing ROS(reactive oxygen species) production and DNA damage. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, 52, 193-199. DOI: 10.1016/j.etap.2017.04.010. ISSN 13826689.
- [47] MORETTI, E., G. TERZUOLI, T. RENIERI, F. IACOPONI, C. CASTELLINI, C. GIORDANO a G. COLLODEL. In vitro effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa. *Andrologia*. 2013, 45(6), 392-396. DOI: 10.1111/and.12028. ISSN 03034569.
- [48] GAO, Guodong, Yuguan ZE, Xiaoyang ZHAO, et al. Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular damage, spermatogenesis suppression, and gene expression alterations in male mice. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, 258-259, 133-143. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.04.046. ISSN 03043894.
- [49] Barkhordari A, Hekmatimoghaddam S, Jebali A, Khalili MA, Talebi A, Noorani M. Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2013;11(9):767-771.
- [50] MARTIALAY, Mary. World's Smallest Comic Strip (Etched on a Strand of Human Hair). In: *The Approach: discovery, innovation, and imagination at Rensselaer Polytechnic*

Institute [online]. Troy (USA): Martialay, 2014, 23 june 2014 [cit. 2018-04-19]. Dostupné z: <http://approach.rpi.edu/2014/06/23/worlds-smallest-comic-strip-etched-on-a-strand-of-human-hair/>

[51] HOLLEROVÁ, Jitka. Prašnost na pracovišti. In: Státní zdravotní ústav [online]. Praha, 14. listopad 2007 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/pracovni-prostredi/prasnost-na-pracovisti-1>

[52] Ryman-Rasmussen, J. P., Riviere, J. E. and Mon-teiro-Riviere, N. A., 2006, Penetration of in-tact skin by quantum dots with diverse physic-ochemical properties, *Toxicol Sci* 91(1), 159-65

[53] IRVINE, DS. DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationships With Semen Quality: Relationships with semen quality. *Journal of andrology*. 2000, vol. 21, issue 1, s. 33-34. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03273.x/abstract>

[54] POPELKOVÁ, Pavla. Studium fragmentace DNA spermií u neplodných mužů. Hradec Králové, 2015. Bakalářská práce. Karlova univerzita, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové katedra biologických a lékařských věd. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

[55] Test fragmentace DNA spermií. In: CYTOGENETICKÁ CYTOBIOPTICKÁ LABORATOŘ [online]. Ostrava-Vítkovice, ©2016 [cit. 2018-05-17]. Dostupné z: [http://www.pathology.cz/wp-content/uploads/2015/03/frag\\_dna.pdf](http://www.pathology.cz/wp-content/uploads/2015/03/frag_dna.pdf)

[56] ČABANOVÁ, Kristina, Hana BIELNIKOVÁ, Oldřich MOTYKA, Pavlína PEIKERTOVÁ, Kateřina DĚDKOVÁ, Jana DVOŘÁČKOVÁ, Kamila HRABOVSKÁ a Jana KUKUTSCHOVÁ. Detection of Micron and Submicron Particles in Human Bronchogenic Carcinomas. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018, 2018(18), 1-7. DOI: 10.1166/jnn.2018.15842.

[57] HAUTOT, D., Q. A. PANKHURST, N. KHAN a J. DOBSON. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite in Alzheimer's disease brain tissue. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003, 270(Suppl\_1), S62-S64. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0012. ISSN 0962-8452.

[58] MAHER, Barbara A., Imad A. M. AHMED, Vassil KARLOUKOVSKI, et al. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences. 2016, 113(39), 10797-10801. DOI: 10.1073/pnas.1605941113. ISSN 0027-8424.

[59] BENCKO, Vladimír, Jaroslav LENER a Miroslav CIKRT. Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka. 2. přepracované a doplněné vyd., v Grada Publishing 1. vyd. Praha: Grada, 1995. ISBN 80-716-9150-X

[60] FRANKLIN, R.B. a L.C. COSTELLO. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009, 106(5), 750-757. DOI: 10.1002/jcb.22049. ISSN 07302312.

[61] KENŠOVÁ, R., D. HYNEK, V. ADAM a R. KIZEK. Působení zinku na živé organismy. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*.

[62] KUKUTSCHOVÁ, Jana, Pavel MORAVEC, Vladimír TOMÁŠEK et al. On airborne nano/micro-sized wear particles released from low-metallic automotive brakes. *Environmental Pollution*. 2011, 159(4), 998-1006. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.11.036. ISSN 02697491.

[63] KUKUTSCHOVÁ, Jana, Pavel MORAVEC, Vladimír TOMÁŠEK et al. On airborne nano/micro-sized wear particles released from low-metallic automotive brakes. *Environmental Pollution*. 2011, 159(4), 998-1006. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.11.036. ISSN 02697491.

[64] KUKUTSCHOVÁ, Jana, Hana RAJHELOVÁ, Pavlína PEIKERTO VÁ, Karla ČECH BARABASZOVÁ, Kateřina MAMULOVÁ KUTLÁKOVÁ, Miroslav VACULÍK a Jana KUKUTSCHOVÁ. Determination of Oxidative Potential Caused by Brake Wear Debris in Non-Cellular Systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2018, 2018(18), 1-7. DOI: 10.1166/jnn.2018.15866.

[65] ŠEDIVCOVÁ, Pavlína. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A JEJICH NEUROFYZIOLOGICKÁ ÚLOHA. Praha, 2012. Diplomová práce. Karlova univerzita, Fakulta tělesné výchovy a sportu. Vedoucí práce Doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.

[66] Copper: PUBLIC HEALTH STATEMENT. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry [online]. Atlanta, September 2004 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132-c1.pdf>

[67] National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water. Copper in Drinking Water. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000. 5, Health Effects of Excess Copper.

- [68] Copper: HEALTH EFFECTS. In: Agency for Toxic Substances and Disease Registry [online]. Atlanta, September 2004 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132-c3.pdf>
- [69] ACHMAD, Risco, BUDIAWAN a Elza AUERKARI. Effects of Chromium on Human Body. *Annual Research & Review in Biology*. 2017, 13(2), 1-8 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.9734/ARRB/2017/33462. ISSN 2347565X.
- [70] Kumar S, Sathwara NG, Gautam AK, et al. Semen quality of industrial workers occupationally exposed to chromium. *J Occup Health*. 2005;47(5):424–430.
- [71] ZHAO, Jiang, Xingyou DONG, Xiaoyan HU, et al. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). DOI: 10.1038/srep22386. ISSN 2045-2322.
- [72] WU, Jinxiang, Shiqiang WU, Yuanzhi XIE, et al. Zinc protects sperm from being damaged by reactive oxygen species in assisted reproduction techniques. *Reproductive BioMedicine Online*. 2015, 30(4), 334-339. DOI:10.1016/j.rbmo.2014.12.008. ISSN 14726483.
- [73] WINDLER, Markus a Ralf KLABUNDE. Titanium for Hip and Knee Prostheses. BRUNETTE, Donald M., Pentti TENGVALL, Marcus TEXTOR a Peter THOMSEN. *Titanium in Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 2001, s. 703-746. *Engineering Materials*. DOI: 10.1007/978-3-642-56486-4\_21. ISBN 978-3-642-63119-1.
- [74] ESPOSITO, Marco. Titanium for Dental Applications (I). BRUNETTE, Donald M., Pentti TENGVALL, Marcus TEXTOR a Peter THOMSEN. *Titanium in Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001, 2001, s. 827-873. *Engineering Materials*. DOI: 10.1007/978-3-642-56486-4\_24. ISBN 978-3-642-63119-1.
- [75] BOYER, R.R. An overview on the use of titanium in the aerospace industry. *Materials Science and Engineering: A*. 1996, 213(1-2), 103-114. DOI: 10.1016/0921-5093(96)10233-1. ISSN 09215093.
- [76] KLAPKOVÁ, A. *Mechanické vlastnosti titanových slitin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2012. 54 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Stanislav Věchet, CSc.

- [77] FALLER, K. a F. H. (SAM) FROES. The use of titanium in family automobiles: Current trends. JOM. 2001, 53(4), 27-28. DOI: 10.1007/s11837-001-0143-3. ISSN 1047-4838.
- [78] PELAEZ, Miguel, Nicholas T. NOLAN, Suresh C. PILLAI, et al. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. Applied Catalysis B: Environmental. 2012, 125, 331-349. DOI: 10.1016/j.apcatb.2012.05.036. ISSN 09263373.
- [79] NAKATA, Kazuya a Akira FUJISHIMA. TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Design and applications. Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. 2012, 13(3), 169-189. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.06.001. ISSN 13895567.
- [80] KATZ, Linda M., Kapal DEWAN a Robert L. BRONAUGH. Nanotechnology in cosmetics. Food and Chemical Toxicology. 2015, 85, 127-137. DOI: 10.1016/j.fct.2015.06.020. ISSN 02786915.
- [81] JAŠKOVÁ, Pavlína. Povrchově aktivní látky v dekorativní kosmetice. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2012, 43 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/23094>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. Vedoucí práce Sedlaříková, Jana.
- [82] CHEN, Xiaobo a Samuel S. MAO. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. Chemical Reviews. 2007, 107(7), 2891-2959. DOI: 10.1021/cr0500535. ISSN 0009-2665.
- [83] JOVANOVIĆ, Boris. Critical review of public health regulations of titanium dioxide, a human food additive. Integrated Environmental Assessment and Management. 2015, 11(1), 10-20. DOI: 10.1002/ieam.1571. ISSN 15513777.
- [84] BAGGS, R. B., J. FERIN a G. OBERDÖRSTER. Regression of Pulmonary Lesions Produced by Inhaled Titanium Dioxide in Rats. Veterinary Pathology. 2016, 34(6), 592-597. DOI: 10.1177/030098589703400607. ISSN 0300-9858.
- [85] RISKEN, KW, GW DANDIE, S. LUGOWSKI a G. JORDAN. A Study of Titanium Release into Body Organs Following the Insertion of Single Threaded Screw Implants into the Mandibles of Sheep. Australian Dental Journal. 2002, 47(3), 214-217. DOI: 10.1111/j.1834-7819.2002.tb00331.x. ISSN 0045-0421.



- [86] LIU, Huiting, Linglan MA, Jinfang ZHAO, Jie LIU, Jingying YAN, Jie RUAN a Fashui HONG. Biochemical Toxicity of Nano-anatase TiO<sub>2</sub> Particles in Mice. *Biological Trace Element Research*. 2009, 129(1-3), 170-180. DOI: 10.1007/s12011-008-8285-6. ISSN 0163-4984.
- [87] NOGUEIRA, Carolina Maciel. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World Journal of Gastroenterology*. 2012, 18(34), 4729-. DOI: 10.3748/wjg.v18.i34.4729. ISSN 1007-9327.
- [88] Guo, Li-li, Xiao-Hui Liu, Ding-xia Qin, Li Gao, Hong-mei Zhang, Jia-Yin Liu and Yugui Cui. Effects of nanosized titanium dioxide on the reproductive system of male mice. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology* 15 6 (2009): 517-22.
- [89] DENG, Zibing, Fei CHEN, Meixia ZHANG, et al. Association between air pollution and sperm quality: A systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2016, 208, 663-669. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.10.044. ISSN 02697491.
- [90] SULLIVAN, JeromeL. IRON AND THE SEX DIFFERENCE IN HEART DISEASE RISK. *The Lancet*. 1981, 317(8233), 1293-1294. DOI: 10.1016/S0140-6736(81)92463-6. ISSN 01406736.
- [91] LOH, Allison, Majda HADZIAHMETOVIC a Joshua L. DUNAIEF. Iron homeostasis and eye disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009, 1790(7), 637-649. DOI: 10.1016/j.bbagen.2008.11.001. ISSN 03044165.
- [92] PETERSEN, Dennis R. Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer. *Alcohol*. 2005, 35(3), 243-249. DOI: 10.1016/j.alcohol.2005.03.013. ISSN 07418329.
- [93] CHAN, Shing, Qizhou LIAN, Mei-Pian CHEN, Dan JIANG, Jolie T.K. HO, Yiu-Fai CHEUNG a Godfrey Chi-Fung CHAN. Deferiprone inhibits iron overload-induced tissue factor bearing endothelial microparticle generation by inhibition oxidative stress induced mitochondrial injury, and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2018, 338, 148-158. DOI: 10.1016/j.taap.2017.11.005. ISSN 0041008X.
- [94] WISE, T., D. D. LUNSTRA, G. A. ROHRER a J. J. FORD. Relationships of testicular iron and ferritin concentrations with testicular weight and sperm production in boars<sup>12</sup>. *Journal of Animal Science*. 2003, 81(2), 503-511. DOI: 10.2527/2003.812503x. ISSN 0021-8812.
- [95] MARZEC-WRÓBLEWSKA, Urszula, Piotr KAMIŃSKI, Paweł ŁAKOTA, et al. Zinc and Iron Concentration and SOD Activity in Human Semen and Seminal Plasma.

Biological Trace Element Research. 2011, 143(1), 167-177. DOI: 10.1007/s12011-010-8868-x. ISSN 0163-4984.

[96] KREWSKI, Daniel, Robert A YOKEL, Evert NIEBOER, et al. Human Health Risk Assessment for Aluminium, Aluminium Oxide, and Aluminium Hydroxide. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 2007, 10(sup1), 1-269. DOI: 10.1080/10937400701597766. ISSN 1093-7404.

[97] MOLD, Matthew, Dorcas UMAR, Andrew KING a Christopher EXLEY. Aluminium in brain tissue in autism. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2018, 46, 76-82. DOI: 10.1016/j.jtemb.2017.11.012. ISSN 0946672X.

[98] FLATEN, Trond Peder. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. Brain Research Bulletin. 2001, 55(2), 187-196. DOI: 10.1016/S0361-9230(01)00459-2. ISSN 03619230.

[99] YU, Qilin, Honggang WANG, Qi PENG, Ye LI, Zhe LIU a Mingchun LI. Different toxicity of anatase and rutile TiO<sub>2</sub> nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids. Journal of Hazardous Materials. 2017, 335, 125-134. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.04.026. ISSN 03043894.

[100] BETTINI, Sarah, Elisa BOUTET-ROBINET, Christel CARTIER, et al. Food-grade TiO<sub>2</sub> impairs intestinal and systemic immune homeostasis, initiates preneoplastic lesions and promotes aberrant crypt development in the rat colon. Scientific Reports. 2017, 7, 40373-. DOI: 10.1038/srep40373. ISSN 2045-2322.